

Charakterisierung von Interaktionen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren in der hypothalamischen Appetitregulation

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität

von

Diplom-Biologin Anne Rediger

geboren am 17.09.1975

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schöne

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Gudrun A. Brockmann
2. PD Dr. Heike Biebermann
3. Prof. Dr. Lutz Schomburg

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2008

Für meine Eltern

Evamaria Rediger & Eike Schmidt

Die Regulation der Nahrungsaufnahme erfolgt zentral im Hypothalamus wo eine Vielzahl von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren exprimiert werden die an der Gewichtsregulation beteiligt sind. Periphere hormonelle Signale aktivieren ihre korrespondierenden Rezeptoren im Nucleus arcuatus (ARC) oder im Nucleus paraventricularis (PVN) und modifizieren dadurch sowohl das anorexigene System, z.B. über die Stimulation des Melanocortin-4-Rezeptors (MC4R) im PVN, als auch das orexigene System mit dem Neuropeptide Y (NPY) sowie dem Agouti-related Protein (AgRP).

Im Zuge einer systematischen Interaktionsstudie wurden verschiedene GPCRs, die entweder mit dem MC3R oder dem MC4R auf dem gleichen Neuron koexprimiert werden und nachweislich die Appetit- und Gewichtregulation beeinflussen, untersucht. Basierend auf den Ergebnissen von Sandwich-ELISA und FRET- (Fluoreszenz-Energie-Transfer) Studien konnte eine Interaktion des MC3R mit dem Growth hormone secretagogues Rezeptor (GHSR) bestimmt werden, die beide auf den NPY/AgRP-Neuronen des ARC lokalisiert sind. Der MC3R gehört zu den G α s bindenden Rezeptoren wohingegen GHSR über den G α q vermittelten Signaltransduktionsweg signalisiert. Es konnte eine Erhöhung der induzierten cAMP-Spiegel infolge der Stimulation des MC3R sowohl mit α -, als auch β - und γ -MSH für die Koexpression von MC3R mit GHSR im Vergleich zum MC3R Homodimer ermittelt werden. Die Charakterisierung des neuen Signalisierungsverhaltens des Heterodimers unter der Verwendung verschiedener Inhibitoren zeigte eine Aktivierung von G α i in Gegenwart der endogenen Agonisten beider Rezeptoren. Die Beobachtung unterschiedlicher Regulationsmuster nach der Kostimulation des Heterodimers in Abhängigkeit von α - oder γ -MSH jeweils in Anwesenheit von Ghrelin verweist auf komplexe Interaktionsmechanismen zwischen dem Melanocortin- und dem Ghrelin-Rezeptor innerhalb der hypothalamischen Gewichtsregulation.

Hypothalamus, Gewichtsregulation, GPCR, Dimerisierung, MC4R, MC3R, GHSR, Signaltransduktion, cAMP

Food intake is centrally regulated in hypothalamic nuclei where many GPCRs are expressed which are known to be involved in weight regulation. Peripheral hormonal signals activate their corresponding receptors in the arcuate nucleus (ARC) or paraventricular nucleus (PVN) and modulate the orexigenic (appetite-suppressing) pathway mediated by stimulation of the melanocortin-4-receptor (MC4R) as well as the anorexigenic (appetite-stimulating) pathway including neuropeptide Y (NPY) and agouti-related protein (AgRP).

In a systematic approach we investigated the interaction of a selective number of GPCRs which are co-expressed on the same neurons like MC3R or MC4R and know to play an essential role in hypothalamic weight regulation. Based on the results of a sandwich ELISA and fluorescence resonance energy transfer (FRET) approach we report the interaction of the MC3R and the growth hormone secretagogue receptor (GHSR) which are co-expressed on arcuate NPY/AgRP neurons. It is known that MC3R couple to the $G_{\alpha s}$ whereas GHSR couple to the $G_{\alpha q}$ signaling pathway. However, here the co-expression of MC3R and GHSR reveal a profoundly increase cAMP-accumulation after melanocortin (α -, β - and γ -MSH) challenge, that is higher compared to MC3R activation alone. In-depth characterization of the new signaling properties of the MC3R/GHSR heterodimer by different inhibitors revealed the activation of $G_{\alpha i}$ in the presents of both endogene agonists. The observation of different regulatory pattern after co-stimulation of the heterodimer depending on the endogenous ligands (α - or γ -MSH) of MC3R reflect complex functional interaction mechanisms between melanocortin and ghrelin receptors within the hypothalamic signaling pathways of weight regulation.

hypothalamus, weight regulation, GPCR, dimerization, MC4R, MC3R, GHSR, signaling pathways, cAMP,

Danksagung

Frau PD Dr. Heike Biebertmann danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten und herausfordernden Dissertationsthemas, sowie für die gute Einführung in das Thema und die tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit.

Ein besonderer Dank auch an Frau Prof. Dr. Gudrun A. Brockmann für die Bereitschaft die vorliegende Arbeit offiziell zu betreuen.

Ein spezieller Dank geht an Frau Prof. Dr. Annette Grütters für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe.

Viele Kooperationen haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, daher danke ich:

- Prof. Dr. Micheal Schäfer und seinen Mitarbeitern vom Institut für Pharmakologie der FU Berlin für die fachliche Unterstützung bei den LSM-Aufnahmen und vor allem für die umfassende Vermittlung der FRET-Methode.
- Prof. Dr. Torsten Schöneberg und PD Dr. Rainer Strotmann vom Institut für Biochemie der Universität Leipzig, die mir zwei Gastaufenthalte in ihrem Labor ermöglicht haben. Ihre fachkundige Einführung in die AlphaScreen-Methode und ihre konstruktiven Diskussionen waren mir eine große Hilfe bei der praktischen Umsetzung der Thematik. In diesem Zusammenhang möchte ich auch die gute Zusammenarbeit mit Claudia Stäubert bei der Erstellung des IP-One-Assays erwähnen.
- Dr. Gunnar Kleinau vom FMP Berlin für die Überlassung der computergestützten Modellierungen des MC3R, MC4R und GHSR.
- Prof. Dr. Annegret Wilde, Dr. Ilka Axmann und Stefan Legewie für die unermüdliche Diskussionsbereitschaft, das stete Interesse an einem für sie artfremden Thema und die Ermutigungen in dunklen Stunden.

Bedanken möchte ich mich auch bei den ehemaligen und gegenwärtigen Kolleginnen der experimentellen pädiatrischen Endokrinologie der Charité, die ich nicht alle einzeln aufzählen kann, von denen aber hoffentlich jede einzelne weiß, dass ihr mein Dank gilt. Mein besonderer Dank gilt Patrick Tarnow für die vertrauensvolle Arbeitsatmosphäre und die kameradschaftliche Zusammenarbeit.

Prof. Dr. Josef Köhrle danke ich für die Aufnahme im Graduierten Kolleg 1208 und für das vermittelte endokrinologische Grundlagenwissen.

1	EINLEITUNG	1
1.1	REGULATION DER NAHRUNGSAufNAHME.....	1
1.1.1	<i>Kurzfristige Kontrolle der Nahrungsaufnahme - Sättigung</i>	2
1.1.2	<i>Langfristige Steuerung der Energiehomöostase</i>	3
1.1.3	<i>Zentren der Appetitregulation</i>	3
1.1.4	<i>Der Leptin-Melanocortin-Weg der hypothalamischen Appetitregulation</i>	4
1.1.5	<i>Anorexigene und orexigene System der hypothalamischen Appetitregulation</i>	5
1.1.5.1	Das anorexigene System der Appetitregulation.....	6
1.1.5.1.1	Anorexigene Effektoren	7
1.1.5.2	Die Familie der Melanocortin-Rezeptoren	8
1.1.5.3	Das orexigene System der Appetitregulation.....	11
1.1.5.3.1	Orexigene Effektoren	11
1.1.5.4	Klinische Relevanz.....	13
1.2	DIE FAMILIE DER G-PROTEIN-GEKOPPELTEN REZEPTOREN	14
1.2.1	<i>Strukturelle Eigenschaften und Klassifizierung der GPCRs</i>	15
1.2.2	<i>Signaltransduktionswege der GPCRs</i>	17
1.2.2.1	Modell der Rezeptoraktivierung	18
1.2.2.2	G-Proteine	19
1.2.3	<i>Di- und Oligomerisierung GPCR</i>	20
1.3	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	22
2	MATERIAL & METHODEN	23
2.1	MATERIAL.....	23
2.1.1	<i>Antikörper</i>	23
2.1.2	<i>Antibiotika</i>	23
2.1.3	<i>Enzyme</i>	23
2.1.4	<i>Hormone</i>	23
2.1.5	<i>Inhibitoren</i>	23
2.1.6	<i>Radioaktive Substanzen</i>	24
2.2	MEDIEN UND PUFFER	24
2.2.1	<i>Medium für Bakterienkulturen</i>	24
2.2.2	<i>Medien für die Zellkultur</i>	24
2.2.3	<i>Puffer für Fluoreszenz Imaging (Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie und FRET)</i>	25
2.2.4	<i>Puffer für Oberflächenbindung</i>	25
2.2.5	<i>Puffer für cAMP-Akkumulationspuffer</i>	26
2.2.6	<i>Puffer für Oberflächen und Sandwich ELISA</i>	27
2.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	27
2.3.1	<i>Klonierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der hypothalamischen Appetitregulation</i>	28
2.3.1.1	Generierung von HA- und Flag-Epitop-markierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren	29
2.3.1.2	Konstruktion der CFP- und YFP-Epitop-markierten Rezeptoren	30
2.3.1.3	Herstellung der MC3R-Mutante I183N sowie der GHSR-Mutanten A204E und F279L	34
2.3.2	<i>RT-PCR</i>	36

2.4	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	37
2.4.1	<i>Zelllinien und Kultivierung</i>	37
2.4.2	<i>Transiente Transfektion</i>	38
2.5	FLUORESZENZ-IMAGING	40
2.5.1	<i>Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie</i>	40
2.5.2	<i>Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)</i>	40
2.5.2.1	<i>Akzeptor-Bleichverfahren</i>	41
2.6	FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG	43
2.6.1	<i>Oberflächenbindung</i>	43
2.6.2	<i>AlphaScreen-basierter cAMP-Akkumulationsassay</i>	43
2.6.3	<i>Bestimmung des intrazellulären Inositolphosphat-Akkumulation (IP-One ELISA)</i>	45
2.7	BIOCHEMISCHE METHODEN	47
2.7.1	<i>Bestimmung der Oberflächenexpression durch ELISA</i>	47
2.7.2	<i>Bestimmung der Dimerisierungseigenschaften durch ELISA (Sandwich ELISA)</i>	48
3	ERGEBNISSE	51
3.1	HOMO- UND HETERODIMERISIERUNG VON HYPOTHALAMISCHEN G-PROTEIN-GEKOPPELTEN REZEPTOREN	51
3.1.1	<i>Subzelluläre Lokalisation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Appetitregulation</i>	51
3.1.1.1	<i>Untersuchung der Oberflächenexpression von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Appetitregulation</i>	52
3.1.2	<i>Subzelluläre Lokalisation von koexprimierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der hypothalamischen Appetitregulation</i>	53
3.1.3	<i>Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der hypothalamischen Appetitregulation</i>	55
3.1.4	<i>Sandwich ELISA</i>	56
3.1.5	<i>Mechanismen der Dimerisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren</i>	58
3.1.5.1	<i>Disulfidbrücken</i>	58
3.1.5.2	<i>Interaktion C-terminal trunkierter MC4R-Konstrukte (FRET)</i>	60
3.2	FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER INTERAKTIONEN DES MC3R	61
3.2.1	<i>cAMP-Akkumulation</i>	62
3.3	GHSR/MC3R HETERODIMER	65
3.3.1	<i>Bestimmung der intrazellulären Inositolphosphat (IP)-Akkumulation</i>	65
3.3.2	<i>cAMP-Stimulation nach Kostimulation des Heterodimers</i>	66
3.3.3	<i>Ligandenbindung</i>	68
3.3.4	<i>Charakterisierung des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweg des GHSR/MC3R Heterodimers</i>	70
3.3.4.1	<i>Nachweis der Isoformen der Adenylat-Cyclase in COS-7-Zellen</i>	71
3.3.4.2	<i>Effekt von Pertussistoxin (PTX) auf die cAMP-Akkumulation des MC3R Homodimers und des GHSR/MC3R Heterodimers</i>	72
3.3.4.3	<i>Effekt von U-73122 auf die cAMP-Akkumulation des GHSR/MC3R Heterodimers</i>	74
3.3.4.4	<i>Effekt des Calmodulin-Inhibitors W7 (N-(6-Aminoheptyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide hydrochloride) auf die cAMP-Akkumulation des GHSR/MC3R Heterodimers</i>	76

3.3.5	<i>Heterodimerisierung und funktionelle Charakterisierung der MC3R- und GHSR-Mutanten</i>	77
4	DISKUSSION	82
4.1	HOMO- UND HETERODIMERISIERUNG VON HYPOTHALAMISCHEN G-PROTEIN-GEKOPPELTEN REZEPTOREN	82
4.1.1	<i>Subzelluläre Lokalisation der heterolog exprimierten GPCRs</i>	86
4.1.2	<i>Mechanismen der Dimerisierung von GPCRs</i>	88
4.1.2.1	Disulfidbrücken können an der Ausbildung von Rezeptordimeren beteiligt sein	88
4.1.2.2	Interaktion von trunkierten MC4R-Konstrukte und dem Wildtyp-Rezeptor	93
4.2	UNTERSUCHUNG DER AUSWIRKUNGEN DER INTERAKTIONEN AUF DEN MC3R-VERMITTELTEN CAMP-ABHÄNGIGEN SIGNALTRANSDUKTIONSWEG	95
4.2.1	<i>Funktionelle Charakterisierung der MC3R-vermittelten cAMP-Akkumulation für die Koexpression von MC3R mit NPY2R bzw. μ-OPR</i>	96
4.2.2	<i>Funktionelle Charakterisierung der Stimulation der Koexpression von MC3R und GHSR mit einem Liganden</i>	99
4.2.2.1	G _{q/11} -Phospholipase C-vermittelte Signaltransduktion (Ligand: Ghrelin)	100
4.2.2.1.1	MC3R-vermittelte Aktivierung des G _q -PLC-abhängige Signaltransduktionsweges (Ligand: α -MSH)	101
4.2.2.2	Funktionelle Charakterisierung der Kostimulation der Koexpression von MC3R und GHSR mit zwei Liganden	102
4.2.2.3	Modifizierung des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges über die Adenylat-Cyclase	104
4.2.2.3.1	Heterodimer-bedingte Veränderung der G-Protein-Kopplung (1) + (2)	106
4.2.2.3.2	Regulation der Adenylat-Cyclase-Aktivität über Ca ²⁺ und Calmodulin sowie PKC (3) + (4)	107
4.2.2.4	Heterodimersierung und funktionelle Charakterisierung der MC3R- und GHSR-Mutanten	109
4.2.2.5	Physiologische Relevanz der Heterodimersierung von MC3R mit GHSR	110
5	ZUSAMMENFASSUNG	112
6	LITERATURVERZEICHNIS	113
6.1	NACHWEIS DER VERWENDETE GPCRS DER HYPOTHALAMISCHEN APPETITREGULATION	126
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	127
8	VERÖFFENTLICHUNGEN	131
9	EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	133

1 Einleitung

Ein gesunder, erwachsener Mensch ist in der Lage, seine Energiereserven und damit sein Körpergewicht über Jahre bis Jahrzehnte konstant zu halten. Dies ist nur möglich dank eines sehr komplexen Regulationssystems, welches uns einerseits vor dem Verhungern und andererseits vor einem „Überfressen“ (Hyperphagie) schützt. Langfristig wird ein Gleichgewichtszustand angestrebt, bei dem die Energieaufnahme durch die Nahrung dem Energieumsatz des Körpers entspricht. Dieser Zustand wird als Energiehomöostase bezeichnet und steht für einen aktiven, metabolischen Prozess.

1.1 Regulation der Nahrungsaufnahme

Es bedarf einer Vielzahl verschiedener peripherer (z.B. Magendehnung, zirkulierende Nährstoffsignale, Hormone) und zentraler (z.B. Geruch und Aussehen der Nahrung) Faktoren um die Nahrungsaufnahme kurz- bzw. langfristig auf den Energiebedarf abzustimmen (Abb. 1). Informationen über die Energieaufnahme und –speicherung werden an ein komplexes Steuerungszentrum im Hypothalamus weitergeleitet und dort integriert.

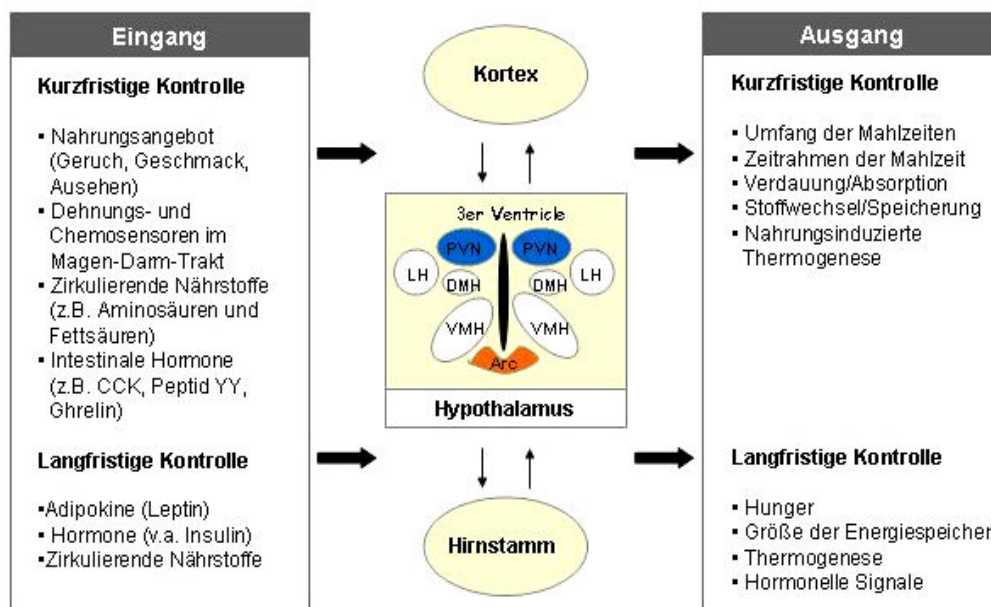


Abbildung 1: Die Regulation der Nahrungsaufnahme

(Modifiziert nach Wilding, 2002; Podingbauer & Ekmekcioglu, 2005). PVN, Nucleus paraventricularis; DMH, dorsomediale Hypothalamuskern; LH, laterale Hypothalamusareale; VMH, ventromediale Hypothalamuskern; ARC, Nucleus arcuatus

1.1.1 Kurzfristige Kontrolle der Nahrungsaufnahme - Sättigung

Kurzfristige Kontrollmechanismen rufen vorrangig Sättigungsgefühle hervor und bewirken so die Beendigung der Nahrungsaufnahme. Ein wichtiger Stimulus ist dabei die Magendehnung (Haupt, 1982). Darüber hinaus sind eine Reihe so genannter Sättigungshormone des Gastrointestinaltraktes (GI-Trakt) bekannt, die die Fähigkeit haben die Größe einer einzelnen Mahlzeit zu reduzieren und deren Wirkung nur kurze Zeit nach der Ausschüttung einsetzt (Podingbauer & Ekmekcioglu, 2005).

Zu ihnen gehören z.B. **Cholecystokinin** (CCK), welches im Verlauf der Verdauung ins Blut sezerniert wird (Moran et al., 2004), die **Glucagon-like-Peptide 1 und 2** (GLP1 und 2) sowie **Ghrelin**. Letzteres wird als „intestinales „Hungerhormon“ bezeichnet, da es im Zusammenspiel mit dem Neuropeptide Y die Nahrungsaufnahme stimuliert (Hagemann et al., 2003). Das überwiegend im Gastrointestinaltrakt sezernierte Peptidhormon bestehend aus 28 Aminosäuren, wurde 1999 von Kojima und Mitarbeitern entdeckt und benannt (Date et al., 2000; de la Cour et al., 2001). Die biologische Aktivität des Peptids ist abhängig von einer N-terminalen n-Oktanylierung an Position 3 (Serin). Die orexigene (appetit-stimulierende) Wirkung von Ghrelin wurde zuerst von Tschöp und Mitarbeitern (2000) für Ratten infolge einer täglichen subkutanen Applikation des Peptidhormons beschrieben. Wren und Mitarbeiter (2001) beobachteten einen Ghrelin-bedingten Anstieg der Nahrungsaufnahme beim Menschen. Die appetitsteigernde Wirkung von Ghrelin wird vermutlich über die Stimulation der Ausschüttung der beiden endogenen Neuropeptide NPY (Neuropeptide Y) und AgRP (Agouti-related Protein) im ARC vermittelt (Lawrence et al., 2002; siehe Abb. 4). Der Ghrelinserumspiegel variiert deutlich mit der Nahrungsaufnahme und dem Ernährungszustand. Die Maximalkonzentration an Ghrelin kann 20-30 Minuten vor Beginn der Mahlzeit gemessen werden, sobald die aufgenommene Nahrung den Magentrakt erreicht sinkt der Spiegel abrupt ab (Schwartz et al., 2000; Cummings et al., 2001 und 2002). Das NPY-ähnliche **Peptid PYY₃₋₃₆** wirkt dem orexigenen Effekt des Ghrelins entgegen.

Weitere wichtige Reize für Hunger- und Sättigungsgefühle sind vermutlich auch **zirkulierende Nährstoffe** (wie z.B. Aminosäuren und Fettsäuren; Havel et al., 2001) und die intrazelluläre Glukoseverfügbarkeit (Nicolaidis & Even, 1990).

1.1.2 Langfristige Steuerung der Energiehomöostase

Parallel gibt es Steuerungsmodule, die Sättigungsgefühle länger aufrechterhalten und darüber die Frequenz der Nahrungsaufnahme beeinflussen (Podingbauer & Ekmekcioglu, 2005).

In der so genannten lipostatischen Hypothese wurde bereits vor mehr als 50 Jahren postuliert, dass ein so genannter Feedback-Mechanismus vorhanden sein muss. Aufgrund dessen würde das Essverhalten gehemmt und der Energieverbrauch erhöht werden, sobald das Körpergewicht einen kritischen Sollwert überschreitet. Kommt es andererseits zu einem drastischen Abfall des Körpergewichtes (unterhalb des Sollwertes), dann wird die Hemmung aufgehoben. Diese Hypothese basiert auf der Voraussetzung, dass ein zirkulierendes Signal existiert, welches den aktuellen Zustand der Energiespeicher, also des Körperfettanteils, an die Gehirnregionen übermittelt, die das Essverhalten und die Aktivität steuern (Kennedy et al., 1953). Als ein bisher gesichertes Langzeitsignal der zentralen Gewichtsregulation gilt **Leptin**, ein metabolisches Adipokin, welches proportional zur Körperfettmasse freigesetzt wird und über die Zirkulation und die Blut-/Hirnschranke zum Hypothalamus gelangt (Considine, 1996; Wang et al., 1998; Woods et al., 1998).

Die beiden Hormone **Insulin** und **Amylin** spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der langfristigen Regulation der Energiehomöostase. Darauf wird unter Punkt 1.1.5.1 näher eingegangen.

1.1.3 Zentren der Appetitregulation

Bereits vor der eigentlichen Nahrungsaufnahme, werden externe Reize (optische Eindrücke, Geruchs- und Geschmackswahrnehmung von Speisen) mit peripheren Signalen, die den Energiestatus des Körpers reflektieren, im Integrationszentrum des vegetativen Nervensystems, dem Hypothalamus verarbeitet. Der Hypothalamus steht sowohl afferent (vom Körper zum zentralen Nervensystem hin) wie efferent (vom zentralen Nervensystem zum Körper hin) mit dem thalamokortikalen System, welches für kognitive Prozesse zuständig ist, und dem limbischen System, das emotionale Prozesse kontrolliert, in Verbindung. Aufgrund einer Kopplung/Verschaltung mit dem Hirnstamm und dem Rückenmark ist die Kontrolle autonomer Funktionen (z.B. der Temperaturregulation, Wach- und Schlafrythmus, Blut- und Atmungsregulation, Wasserhaushalt, Sexualfunktion und der Nahrungsaufnahme) gegeben. Durch die Steuerung der Hypophyse über Releasing-oder Inhibiting-Hormone wird auch das endokrine System (Schilddrüse, Nebenniere, Pankreas) beeinflusst. Ein negatives Rückkopplungssystem zwischen Hypothalamus, Hypophyse und endokrinen Drüsen bewirkt einen stabilen

Hormonhaushalt und wird von höheren zentralnervösen Strukturen an akute Bedürfnisse des Organismus angepasst (Hypophysen-Hypothalamus-Achse).

Der Hypothalamus lässt sich anhand seiner Anatomie in mediale und laterale Kerne unterteilen. Die für die Gewichtsregulation und Energiehomöostase wichtigen Kernregionen sind der Nucleus arcuatus (ARC), der Nucleus paraventricularis (PVN), die entromedialen (VMN) und dorsomedialen (DMN) Hypothalamuskern sowie die lateralen Hypothalamusareale (LH) (Satoh et al., 1998; Bagnol, 2004) (siehe Abb. 1).

Die Schlüsselposition der hypothalamischen Appetitregulation nimmt der ARC mit seinen zwei Gruppen von Neuronen – den **NPY/AgRP-Neuronen** und den **POMC/CART-Neuronen** - ein, die parallel in andere Regionen des Hypothalamus projizieren, allerdings mit entgegengesetztem Effekt auf die Nahrungsaufnahme und die Energiehomöostase. In Abhängigkeit von verschiedenen peripheren Signalen wird sowohl die Expression der orexigenen Neuropeptide des NPY/AgRP-Neurons (Neuropeptide Y, NPY und Agouti-related Protein, AGRP) als auch der anorexigenen Neuropeptide des POMC/CART-Neurons (Proopiomelanocortin, POMC; Cocain- und Amphetamin-regulierendes Transkript, CART) reguliert.

1.1.4 Der Leptin-Melanocortin-Weg der hypothalamischen Appetitregulation

Leptin ist ein Proteohormon, das vom Fettgewebe sezerniert wird und über den Blutkreislauf ins Gehirn gelangt. Da der Leptinspiegel sich proportional zum aktuellen Körperfettgehalt und somit auch zum Körpergewicht verhält, nimmt dieses Hormon eine Schlüsselrolle im Rahmen der Gewichtsregulation ein. Es realisiert die Übersetzung peripherer Verhältnisse in zentrale Signale (Considine et al., 1996; Wang et al., 1998; Woods et al., 1998).

Leptin wurde 1994 von Jeffrey Friedman als Produkt des *OB*-Gens im Rahmen einer Knock-out-Studie bei Mäusen entdeckt (Zhang et al., 1994). Die Bezeichnung des Gens (*OB* = „obese“, engl. für fettleibig) ist auf den äußerst charakteristischen adipösen Phänotyp der Knock-out-Mäuse zurückzuführen. Das ob/ob-Maus-Modell weist das Verhalten und die Physiologie von Tieren auf, die sich in einem ständigen Hungerzustand befinden. Sie sind nicht in der Lage ihre Körperwärme aufrecht zu halten oder sich normal fortzupflanzen. Darüber hinaus zeigen sie kein normales Wachstum und verfügen über einen erhöhten Appetit, was letztendlich ein dreimal höheres Gewicht als Wildtyp (WT)-Tiere zur Folge hatte (Chua et al., 1996). Injiziert man diesen ob/ob-Mäusen Leptin, so kommt es zu einer Erhöhung der lokomotorischen Aktivität und die Tiere verlieren deutlich an Gewicht (Halaas et al., 1995). Ein vergleichbarer Phänotyp wurde bedingt durch einen Defekt des *DB* (für Diabetes)-Gens beobachtet, welches für den Leptinrezeptor codiert

(Harvey & Ashford, 2003). Ein Defekt des Rezeptors ist gleich bedeutend mit dem Verlust oder der Mutation des Leptingens. Das Ausbleiben der Informationsübermittlung über den Stand der Energiespeicher hat eine gesteigerte Nahrungsaufnahme (Adipositas, Hyperphagie) sowie sinkende metabolische Raten zur Folge.

Die sechs Isoformen des Leptin-Rezeptors (ObRa - f), welche sich nur in der C-terminalen Struktur unterscheiden, sind alternative Splice-Produkte des Diabetes (db)-Gen. Nur die lange (ObRb) Isoform spielt eine wichtige Rolle bei der Signalweiterleitung. Hohe Konzentrationen dieses Rezeptors findet man in den Kerngebieten des Hypothalamus, die das Essverhalten regulieren, vorwiegend im ARC (Friedman & Halaas, 1998). Der Leptin-Rezeptor gehört zur Klasse I der Cytokine-Rezeptor-Superfamilie, die über die Aktivierung der sog. Janus-Kinasen (JAK) STAT-Proteine (STAT: signal transducer and activator of transcript) phosphorylieren und so die Transkription bestimmter Gene reguliert (Campfield et al., 1995; Tartaglia et al., 1995; Zhang et al., 1994). Das Leptin-Signal im Hypothalamus wird gehemmt durch SOCS-3, einem Inhibitor der Janus-Kinasen und durch die Dephosphorylierung des Rezeptors durch PTP-1B (Tyrosine-Phosphatase 1B) (Flier et al., 2004).

1.1.5 Anorexigene und orexigene System der hypothalamischen Appetitregulation

Leptinrezeptoren konnten in den beiden unterschiedlichen Populationen von Neuronen im ARC identifiziert werden, daher beeinflusst Leptin sowohl das anorexigene (Nahrungsaufnahme-hemmende) als auch das orexigene (Appetit-stimulierende) System der hypothalamischen Appetitregulation. Die Produktion der orexigenen Neuropeptide AgRP und NPY wird durch die Aktivierung des Leptinrezeptors gehemmt. Die Bindung von Leptin an seinen Rezeptor auf dem zweiten Neuronen-Typ (POMC/CART) resultiert in der Stimulation von anorexigenen Effektorsystemen. Kommt es zur Reduktion der Energiespeicher, dann sinkt im selben Masse auch die zirkulierende Leptinkonzentration und dies bewirkt wiederum eine Zunahme der appetit-stimulierenden Effektormodule.

Eine Übersicht über einige an der hypothalamischen Appetitregulation beteiligten anorexigenen und orexigenen Neurotransmitter und Neurotransmitter gibt Tabelle 1.

1.1.5.1 Das anorexigene System der Appetitregulation

Die Bindung von Leptin an seinen Rezeptor ObRb bedingt die Stimulation der im ARC lokalisierten POMC/CART-Neuronen und vermittelt den anorexigenen Effekt des Leptins (Kristensen et al., 1998; siehe Abb.2).

Das anabole Hormon Insulin stimuliert ebenfalls das anorexigene System der hypothalamischen Appetitregulation. Die Freisetzung des Peptidhormons aus den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas wird u.a. durch Glucose stimuliert. Gemeinsam mit dem Antagonisten Glucagon hält Insulin den Blutzucker-Spiegel innerhalb bestimmter physiologischer Grenzen konstant, dabei hat Glucagon anhebende, Insulin absenkende Wirkung. Insulin signalisiert über einen Tyrosinkinase-Rezeptor (IR), der zusammen mit dem Ob-Rb im ARC auf denselben Neuronen koexprimiert wird.

Tabelle 1: Übersicht über einige orexigene und anorexigene Neuropeptide und Neurotransmitter der hypothalamischen Appetitregulation (modifiziert nach Podingbauer & Ekmekcioglu, 2005)

Orexigen	Anorexigen
<ul style="list-style-type: none"> • induziert eine positive Energiebilanz, Nahrungsaufnahme \uparrow und /oder Energieverbrauch \downarrow 	<ul style="list-style-type: none"> • induziert eine negative Energiebilanz, Nahrungsaufnahme \downarrow und /oder Energieverbrauch \uparrow
Neuropeptide Y (ARC) Agouti-related Protein (ARC) Melanin-Concentrating-Hormon (MCH) (LH) Orexin A und B (LH, DMH) Galanin (ARC, PVN, DMH) Ghrelin Endogene Opioide (ARC, LH) Endogene Cannabinoide	Leptin α-Melanozyten-stimulierendes Hormon (MSH) (ARC) Corticotropin-Releasing-Hormon (PVN) Thyrotropin-Releasing-Hormon Cocain- und Amphetamin regulierendes Transkript (CART) (ARC) Neurotensin Serotonin Glucagon-like Peptide (PVN)

Das im Gastrointestinaltrakt synthetisierte NPY-ähnliche **Peptid PYY₃₋₃₆** bindet als Agonist an den NPY-Rezeptors 2 (NPY2R) und aktiviert dadurch die Feedbackschleife des NPY/AgRP-Neurone im Nucleus arcuatus (ARC). Dies hat die Inhibition der Ghrelin-vermittelten Expression des NeuropeptidY und des Agouti-related Protein zur Folge.

1.1.5.1.1 Anorexigene Effektoren

Die Stimulation der Expression von **CART** löst einen Appetit-hemmenden Effekt aus. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass die Injektion des CART-Peptids in den lateralen Ventrikel eine Reduktion der Nahrungsaufnahme bewirkt (Lambert et al., 1998). Darüber hinaus wurde *in vitro* nachgewiesen, dass CART-Peptide die Synthese des Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) und des Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH) induzieren können. Allerdings konnten diese Beobachtungen nicht beim Menschen bestätigt werden (Menyhért et al, 2007).

Infolge der Expression von Proopiomelanocortin (POMC) kommt es zur Erhöhung der Konzentration einer Vielzahl von anorexigenen Hormonen, da POMC ein Vorläuferprotein darstellt, das posttranslational durch die Prohormon-Konvertasen 1 und 2 in verschiedene Neuropeptide prozessiert wird (Seidah et al., 1999)(siehe Abb. 3A). **POMC** codiert u.a. für verschiedene Melanocortine (α -, β - und γ -MSH) sowie das Adrenocortikotrophe Hormon (ACTH)(Whitfeld et al., 1982; Millington et al., 2001). Eine POMC-Defizienz hat demzufolge weitreichende phänotypische Auswirkungen. Beim Menschen und im Mausmodell wurde Hyperphagie, Adipositas, gesteigertes Längenwachstum sowie einen Defekt der Nebennierenentwicklung und der Hautpigmentierung beobachtet (Dubern et al., 2001; Krude et al., 1998 & 2003; Yaswen et al., 1999).

Das α - als auch das **β -Melanocyten-stimulierende Hormon (MSH)** sind Agonisten des Melanocortin-4-Rezeptors (MC4R), der v.a. im PVN exprimiert wird und einen Großteil der anorexigenen Wirkung des Leptins vermittelt (Cone et al., 1996; Mountjoy et al., 1994; siehe Abb. 2). Die Neuropeptide α -, β - sowie γ -MSH stimulieren darüber hinaus ein anderes Mitglied der Familie der Melanocortin-Rezeptoren, den Melanocortin-3-Rezeptor (MC3R) (Gantz et al., 1993; Roselli-Rehfuss et al., 1993). Da dieser im Hypothalamus hauptsächlich in den NPY/AgRP-Neuronen exprimiert wird, stellt MC3R eine Verbindung zwischen dem anorexigenen und dem orexigenen System der Appetitregulation dar. Welche Funktion er in diesem regulatorischen Netzwerk einnimmt ist bislang unklar. Neben der Energiehomöostase stellt α -MSH auch einen wichtigen Faktor der Thermogenese durch das braune Fettgewebe sowie der Pigmentierung von Haut und Haar dar.

spezifisch durch ACTH aktiviert. Die Funktion des **MC5R**, dessen Expression in endokrinen Drüsen nachgewiesen werden konnte, ist bisher unklar (Millington, 2006; Zhang et al., 2006).

MC3R und MC4R sind an der hypothalamischen Appetitregulation und folglich auch an der Regulation des Energiehaushaltes beteiligt. Der **MC3R** wird vorrangig im Nucleus arcuatus exprimiert, daneben findet man ihn auch in der Plazenta und im Darmgewebe. Von zwei unabhängigen Gruppen konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einer Defizienz des MC3R (MC3R $-/-$) eine deutlich erhöhte Körperfettmasse bei einem weitestgehend unveränderten Körpergewicht (Butler et al., 2000; Chen et al., 2000). Die ermittelten Serumwerte der Versuchstiere deuten auf eine Hyperleptinämie hin, wobei Körpertemperatur und metabolische Rate unverändert waren. Die Ursachen für die beobachtete Erhöhung der Fettmassen sind zwar noch ungeklärt, es besteht jedoch die Vermutung, dass MC3R die effiziente Speicherung der aufgenommenen Nahrung vermittelt und so Einfluß auf die Energiehomöostase ausübt.

Die Expression des MC3R konnte im ARC sowohl für NPY/AgRP-Neuronen als auch für POMC/CART-Neuronen gezeigt werden (Bagnol, 1999). Der Nachweis von AgRP immunoreaktiven Synapsen, die an POMC-immunoreaktiven Zellkörpern lokalisiert sind, legte die Vermutung hinsichtlich eines inhibitorischen Regelkreises im ARC nahe. Durch die Inhibierung des MC3R über AgRP kommt es zu einer Hemmung der anorexigenen POMC/CART-Neuronen, was letztendlich eine Verstärkung des orexigenen Signals bedeutet. In diesem Zusammenhang würde der MC3R die Rolle eines inhibitorischen Autorezeptors auf den POMC/CART-Neuronen ausüben.

Knock-out-Mäuse des überwiegend im Nucleus paraventricularis exprimierten **MC4R** zeigen eine früh entwickelte Adipositas mit Hyperphagie, gesteigerter Körperfettmasse und gesteigertem Längenwachstum sowie Hyperinsulinämie und Hyperleptinämie (Huszar et al., 1997; Ste Marie et al., 2000). Ein mehr oder weniger vergleichbarer Phänotyp wurde auch beim Menschen beobachtet (Farooqi et al., 2003). Verursacht wird diese Symptomatik durch die Hyperphagie und einen reduzierten Energieumsatz. Bislang sind mindestens 90 charakterisierter Mutationen bekannt, die u.a. zu einer intrazellulären Retention des Rezeptors (Lubrano-Bertheliet al., 2003) oder in anderen Fällen zum selektiven Verlust der Affinität gegenüber dem Agonisten und der Signaltransduktion (Yeo et al., 2003) führten. Damit stellt der MC4R zurzeit eine der genetischen Hauptursachen der Adipositas dar (Coll et al., 2004). Eine Studie konnte Variationen im *MC4R* Gen mit dem Fehlen körperlicher Bewegung assoziieren (Loos et al., 2005).

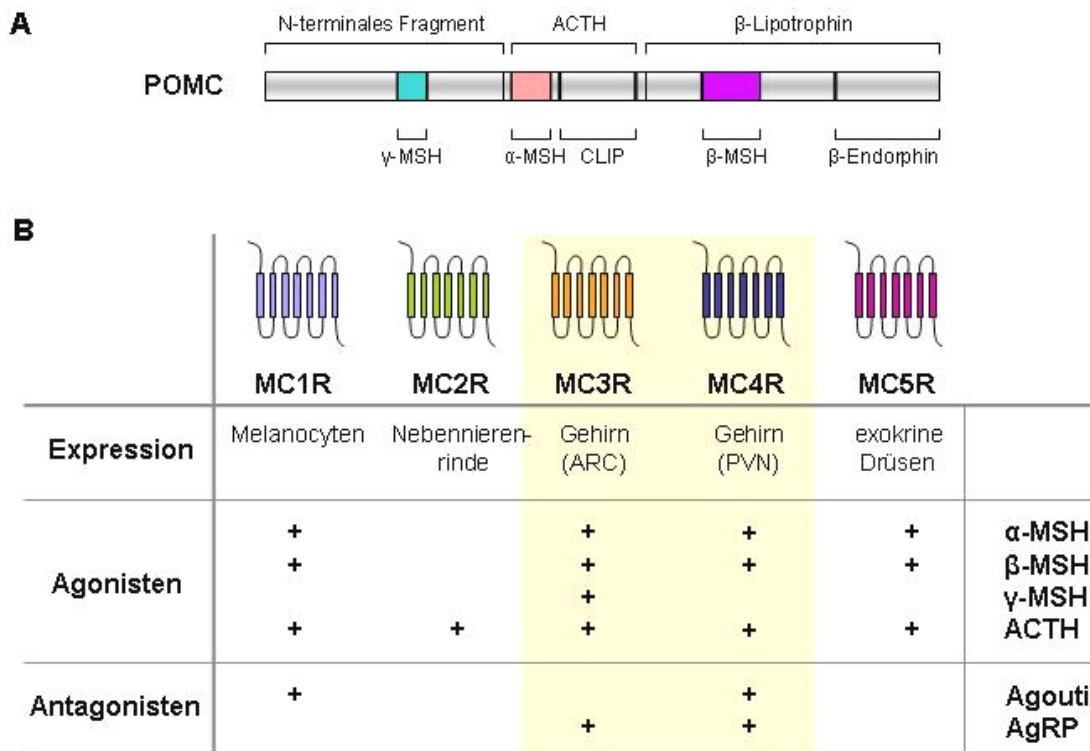


Abbildung 3: (A) Die Struktur des POMC und (B) die Familie der Melanocortin-Rezeptoren

A: Das Gen-Produkt des *POMC*-Gens ist ein Polypeptid, das durch spezifische Proteasen gespalten wird, wobei eine Reihe von anorexigenen Effektoren freigesetzt werden. **B:** In tabellarischer Form sind hier die fünf bekannten Mitglieder der Familie der Melanocortin-Rezeptoren (MC1-5R) sowie Angaben zur Expression und den spezifischen Liganden zusammengefasst.

Für das humane *MC3R* Gen sind zwei Polymorphismen bekannt (Thr6Lys und Val181Ile), die aber sowohl in adipösen als auch in normalgewichtigen Kontrollen vorkommen und daher nicht eindeutig mit einem Phänotyp assoziiert werden (Li et al., 2000; Schalin-Jantti et al., 2003; Hani et al., 2001; Wong et al., 2002). Für die Doppel-Mutation des Rezeptors (T6K/V81I) konnte hingegen bei Kindern eine frühmanifeste Adipositas beobachtet werden (Feng et al., 2005). Neben einer leicht reduzierten Ligandenbindung wurde auch eine verminderte Signaltransduktion *in vitro* nachgewiesen. Ein kompletter Verlust der Rezeptorfunktion wurde für den Austausch von Isoleucin gegen Asparagin an der Position 183 ermittelt (Tao & Segaloff, 2004). Bisher sind jedoch nur zwei Träger dieser Mutation bekannt (Lee et al., 2002), beide mit einem adipösen Phänotyp. Vor kurzem wurden bei adipösen Kindern und Jugendlichen zwei weitere *MC3R*-Mutationen entdeckt, die ein Aminosäureaustausch von Alanin zu Threonin an der Position 70 und ein Austausch von Methionin zu Isoleucin an der Position 134 bewirken (Lee et al., 2007).

Versuchstiere, bei denen sowohl der MC3R als auch der MC4R deletiert wurden, wiesen im Gegensatz zum MC4R Knock-out eine signifikantere Adipositas auf. Die über die beiden Melanocortin-Rezeptoren vermittelten Effekte sind daher vermutlich nicht redundant.

1.1.5.3 Das orexigene System der Appetitregulation

Parallel zur Aktivierung des anorexigenen Systems erfolgt durch die Bindung von Leptin an seinen Rezeptor auf den NPY/AgRP-Neuronen des ARC eine Hemmung der Expression der orexigenen Neuropeptide (Baskin et al., 1999; Wilson et al., 1999). Wohin gegen die Bindung des intestinalen „Hungerhormons“ Ghrelin an den Growth-Hormone Secreteagogue-Rezeptoren (GHSR), eine Aktivierung der NPY/AgRP-Neuronen bewirkt und letztendlich die Nahrungsaufnahme stimuliert (Abb. 4).

1.1.5.3.1 Orexigene Effektoren

Die Aktivierung des GHSR durch seinen endogenen Ligand Ghrelin bewirkt die Expression der orexigenen Peptide der NPY/AgRP-Neuronen, Neuropeptide Y (NPY) und Agouti-related Protein (AgRP) (Abb. 4). Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass die Injektion von NPY zur Stimulation der Nahrungsaufnahme und zur Reduktion des Energieverbrauches führte, was letztendlich die Entwicklung von Adipositas beschleunigte (Stanley et al., 1985; Zarjevski et al., 1993). Die NPY/AgRP-Neuronen projizieren hauptsächlich in den PVN, die LH und den DMN, aber auch in den ARC selbst (Hahn et al., 1998).

Der Rezeptor des **Neuropeptid Y** gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Die Weiterleitung des extrazellulären Signals erfolgt in diesem Fall über G_i-Proteine, die die intrazelluläre cAMP-Produktion über die Inhibierung der Adenylat Cyclase (AC) steuern.

1. $\frac{1}{2}$ 2. $\frac{1}{2}$ 3. $\frac{1}{2}$ 4. $\frac{1}{2}$ 5. $\frac{1}{2}$ 6. $\frac{1}{2}$ 7. $\frac{1}{2}$ 8. $\frac{1}{2}$ 9. $\frac{1}{2}$ 10. $\frac{1}{2}$

Zusammen mit dem Neuropeptide Y wird das **Agouti-related Protein** (AgRP), ein Homolog des peripher gebildeten Agouti-Proteins (Ollmann et al., 1997) in den NPY/AgRP-Neuronen des ARC im Hypothalamus koexprimiert. Seine Synthese ist in Zeiten reduzierter Nahrungsaufnahmen hochreguliert. Es gilt als das „robusteste“ orexigene Hormon (Morton et al., 2001). Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass die intracerebroventrikulärer Injektion des AgRP eine vermehrte Nahrungsaufnahme hervorruft (Nijenhuis et al., 2001; Rossi et al., 1998). Im Vergleich zu NPY, wo der induzierte Effekt bereits nach wenigen Stunden nachlässt, hält er bis zu einer Woche an. AgRP ist ein inverser Agonist der beiden im Hypothalamus exprimierten Melanocortin-Rezeptoren MC3R und MC4R und konkurriert mit den anorexigenen Neuropeptiden (z.B. α -MSH) um die Bindungsstelle am Rezeptor.

1.1.5.4 Klinische Relevanz

Das Verständnis der verschiedenen Mechanismen in der Regulation der Nahrungsaufnahme ist von großer Relevanz, da Adipositas, die krankhafte Fettleibigkeit, in zunehmendem Maße ein globales Gesundheitsproblem darstellt. Das sehr komplexe Krankheitsbild bedingt Stoffwechselstörungen (Diabetes mellitus, Dyslipidämie), kardiovaskuläre Erkrankungen, Bluthochdruck und bestimmte Formen von Krebs, was letztendlich zu einer höheren Morbidität und Mortalität führt. Die Zunahme von Fettmasse ist grundsätzlich auf eine langfristig erhöhte Energiezufuhr zurückzuführen, die vom Körper nicht verbraucht werden kann und daher in Form von Fett gespeichert wird. In den letzten Jahren wurde jedoch immer deutlicher, dass die Adipositas eine multifaktoriell bedingte Störung ist. Neben psychosozialen Gründen (wie z.B. Bewegungsmangel, Stress) werden daher in diesem Zusammenhang auch immer stärker biochemische und genetische Ursachen diskutiert, die beispielsweise eine Störung des Leptin-Melanocortin-Systems, welches ein wichtiger Bestandteil der Gewichtsregulation ist, hervorrufen.

Humane Leptindefizienzen (syndromale Adipositas) sind sehr seltenen (Montague et al., 1997; Strobel et al., 1998). Allerdings konnte auch hier, wie im Tierversuch, durch die Verabreichung von rekombinantem Leptin eine Reduktion des Körpergewichtes beobachtet werden (Farooqi et al., 1999). Trotz erhöhter Leptinspiegel sind jedoch viele adipöse Patienten nicht zu einer effizienten Kontrolle ihrer Nahrungsaufnahme in der Lage. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung stellt ein auf Leptinresistenz basierender Mechanismus, ähnlich der Diabetes mellitus Typ II, dar (Caro et al., 1996). Vermutlich entwickelte sich das Leptinsystem, damit Tiere in Fasten- und Hungerperioden ihre Aktivität und ihren Stoffwechsel anpassen, um möglichst lang

zu überleben. Die aufgrund von Nahrungsmangel ausgelöste Reduktion des Körpergewichtes und somit der Leptin-Konzentration bewirkt einerseits eine verringerte Produktion von Thyroidhormonen, was zu einer Drosselung des Grundumsatzes führt. Andererseits führt die erhöhte Produktion von Glucocorticoiden zur Mobilisierung der brennstoffezeugenden Ressourcen des Körpers. Im Zuge der Minimierung des Energieverbrauches und der Maximierung der Nutzung endogener Energiereserven wird die Synthese von Geschlechtshormonen reduziert. Ein Beispiel dafür sind auch erniedrigten Leptin- und Östrogenspiegel bei Anorexia nervosa (Magersucht), die von der geringen Körperfettmasse herresultieren (Hebebrand et al., 1999).

Die bisherigen Studien legen nahe, dass es einen Zusammenhang zwischen MC4R-Mutationen und Adipositas gibt (Vaisse et al., 2000). Zumal MC4R als auch MC3R wichtige Informationsübertragungen innerhalb der hypothalamischen Appetitregulation realisieren. Ein möglicher Ansatzpunkt für neue anorexigenwirksame Medikamente der Adipositas-therapie könnten daher die Agonisten der beiden Rezeptoren sein (Fehm et al., 2001).

1.2 Die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Die Informationen von den verschiedensten extrazellulären Signalen (z.B. chemische Signale wie Neurotransmitter, Cytokine oder Peptidhormone, aber auch physikalische Signale wie Licht) werden von membranständigen Rezeptoren ins Zellinnere vermittelt. Dazu gehören die Rezeptortyrosinkinasen (Lowes et al., 2002; Patel, 2004) sowie die Liganden-gesteuerten Ionenkanälen (Wickman et al., 1995). Die größte Gruppe stellen dabei die G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR, auch als 7-Helix-Rezeptoren bezeichnet) dar. Ihre Sequenzen nehmen ca. 2 % des humanen Genoms ein, wobei ungefähr die Hälfte der bislang ermittelten GPCR extrazelluläre Signale über die Bindung endogener Liganden erkennen (Fredriksson et al., 2003; Vassilatis et al., 2003). Im Vergleich zu anderen Organen und Geweben wird im Gehirn, speziell im Hypothalamus, die größte Anzahl an GPCR exprimiert. Darüber hinaus konnte vielfach gezeigt werden, dass ein großer Teil der an der Appetitregulation beteiligten Rezeptoren zu dieser Gruppe der membranständigen Rezeptoren gehört (Bagnol, 2004). Die Vielfältigkeit ihrer Aktivatoren und der durch sie kontrollierten Prozesse macht sie zu einem wichtigen Ansatzpunkt für die Entwicklung von Medikamenten.

1.2.1 Strukturelle Eigenschaften und Klassifizierung der GPCRs

Eine strukturelle Gemeinsamkeit der GPCR sind die heptahelikalen Transmembrandomänen (7 TM), die aus 20 bis ca. 30 Aminosäuren bestehen. Sie sind über drei extrazelluläre (ecl) und drei intrazelluläre (icl) Schleifen miteinander verbunden sind (Ballesteros & Weinstein, 1994). GPCR weisen einen extrazellulär gelagerten N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus auf. Informationen über die räumliche Anordnung der einzelnen Domänen lieferten die Kristallstrukturanalysen des bovinen Rhodopsins (Schertler, 1998; Palczewski et al., 2000). Intrazellulär betrachtet sind die Transmembrandomänen zirkulär im Uhrzeigersinn und eng gepackt in der Membrane angeordnet. Im Jahr 2007 gelang die Aufklärung der Kristallstruktur eines Liganden-aktivierten GPCR (humane β_2 -Adrenorezeptor)(Rasmussen et al., 2007).

Aufgrund der geringen Sequenzhomologie innerhalb der Familie der GPCR wurde die systematische Klassifizierung in drei Untergruppen anhand funktioneller und phylogenetischer Merkmale erstellt. Die Sub-Familie 1 fasst die Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren zusammen und stellt zugleich die größte der fünf Untergruppen dar. Die Zuordnung zu dieser Gruppe der GPCR erfolgte aufgrund charakteristischer konservierter Aminosäure-Motive, die in fast allen Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren zu finden sind. Beispielsweise das NSxxNPxxY-Motiv in TM 7 und das DRY-Motiv am Übergang zwischen TM 3 und der icl2 belegen eine gemeinsame Abstammung (Fredriksson et al., 2003). Letzterem werden für unterschiedliche Rezeptoren jeweils spezifische Funktionen zugeschrieben, wie z.B. die Ausbildung einer Salzbrücke zwischen ecl1 und ecl2 (Acharya & Karnik, 1996) oder die Aktivierung von G-Proteinen. Wohingegen für andere Rezeptoren eher ein Einfluß auf die korrekte Faltung und den Transport nachgewiesen werden konnte (Schulz et al., 2000a). Das NSxxNPxxY-Motiv kommt in der Rezeptoraktivierung und Regulation zum Tragen. Die am stärksten konserviert Aminosäure ist ein Aspartat in der Transmembrandomäne 2 (TM2). Ein Mutations-bedingter Aminosäureaustausch kann hier eine erhebliche Beeinträchtigung der Signaltransduktion zur Folge haben (Valverde et al., 1996; Sealfon et al., 1995). Darüber hinaus wird eine Disulfidbrücke, die bei ca. 80 % der GPCR dieser Sub-Familie vorkommt, zwischen je einem Cystein in der extrazellulären Schleife (ecl)1 und 2 ausgebildet. Große extrazelluläre Domänen sind in dieser Gruppe eher selten, eine Ausnahme stellen die Glykoproteinrezeptoren und Follikel-stimulierenden-Hormon Rezeptoren dar, die eine eigene Unterfamilie innerhalb dieser Gruppe bilden. Die Einteilung der Unterfamilien basiert auf den unterschiedlichen Domänen der Rezeptoren, die an der jeweiligen Ligandenbindung beteiligt sind.

Die Sub-Familie 2 umfasst Rezeptoren, deren Liganden, meist große Peptide (wie z.B. die gastrointestinalen Peptidhormone) an den langen N-Terminus (ca. 60 – 80 Aminosäuren) des Rezeptormoleküls binden.

Zur Sub-Familie 3, welche die kleinste der drei Gruppen darstellt, gehören Rezeptoren, die ebenfalls eine sehr große (280 – 580 Aminosäuren) extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne aufweisen.

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Rezeptoren gehören zu den Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren, sie werden in der Tabelle 2 kurz vorgestellt. Für alle ausgewählten GPCRs konnte eine Expression im ARC oder im PVN nachgewiesen werden. Ihr jeweiliger Einfluss auf die Appetit- und Gewichtsregulation wurde entweder anhand von Knock-out-Mausmodellen oder durch intracerebroventrikuläre Injektionsstudien mit spezifischen Liganden bestimmt. Die entsprechende Literatur ist gesondert im Literaturverzeichnis unter 5.1. aufgelistet.

Tabelle 2: Zusammenfassung, der in dieser Arbeit verwendeten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die in die hypothalamische Appetitregulation involviert sind.

Rezeptor	endogener Ligand	Nahrungsaufnahme	hypothalamische Expression	Signaltransduktion
MC4R	α -, β -MSH; AgRP	↓	PVN	G _s
MC3R	α -, β -, γ -MSH; AgRP	↓	ARC	G _s
GPR7	Neuropeptide W/B	↑ ↓ ?	PVN, DMH, VMH	G _i , G _{q/11} ?
5-HTR _{1B}	Serotonin	↓	LH, PVN, VMN	G _i
NPY2R	NPY, PYY ₃₋₃₆	↑	ARC, PVN	G _i
CB1R	Anandamide, Cannabinoide	↑	PVN, VMH	G _i
μ -OPR	β -Endorphin	↑	ARC	G _i
GHSR	Ghrelin	↑	ARC, VMH	G _{q/11}

GPR7, G-Protein-gekoppelter Rezeptor 7; 5-HTR_{1B}, Serotonin-1B-Rezeptor; NPY2R, Neuropeptid-Y-Rezeptor 2; CB1R, Cannabinoid-1-Rezeptor; μ -OPR, μ -Opioid-Rezeptor; GHSR, Growth-Hormone Secretagogue-Rezeptor; ↑ Appetit-stimulierender, orexigener Effekt; ↓ Nahrungsaufnahme-hemmender, anorexigener Effekt; PVN, Nucleus paraventricularis; DMH, dorsomediale Hypothalamuskern; LH, laterale Hypothalamusareale; VMH, ventromediale Hypothalamuskern; ARC, Nucleus arcuatus

1.2.2 Signaltransduktionswege der GPCRs

GPCR übertragen extrazelluläre Signale mit Hilfe von G-Proteinen auf nachgeschaltete Enzyme oder Ionenkanäle, welche die intrazelluläre Konzentration von Ionen und sekundären Botenstoffen verändern. Die Aktivierung von Adenylat-Cyclasen (Sunahara & Taussig, 2002) führt zur Produktion des second messenger zyklisches Adenosin-3'-5'-monophosphat (cAMP). Die Phospholipase C stellt ein weiteres Effektorprotein dar, dessen Aktivierung die Freisetzung von Diacylglycerol (DAG) sowie Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) bewirkt. Von der cAMP-Konzentration ist die Aktivität der Proteinkinase A abhängig, die IP₃-Konzentration hingegen bestimmt die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern. Das generelle Prinzip der Signaltransduktion durch G-Proteine und deren membranständigen Rezeptoren ist in der Abb. 5 dargestellt.

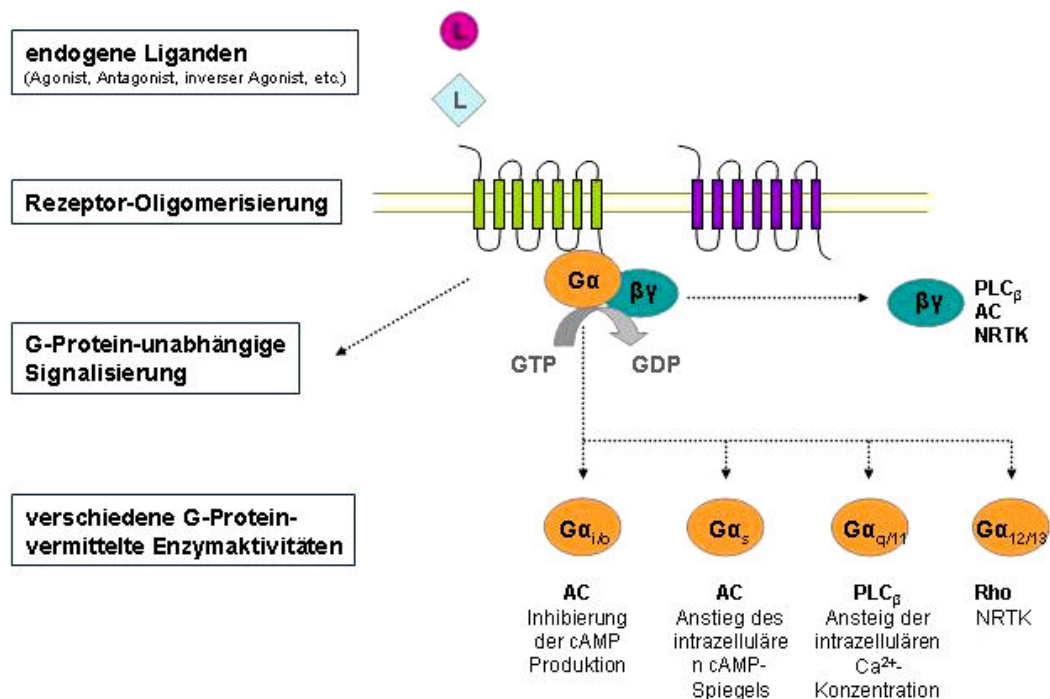


Abbildung 5: Prinzipien der Signaltransduktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

In einigen Fällen binden GPCRs mehrere endogene Liganden (Agonisten, Antagonisten, inverse Agonisten etc.), die ihre Aktivität differentiell regulieren. Die jeweils induzierte Signaltransduktion wird durch die Aktivierung spezifischer G-Proteine realisiert, wobei es aber auch zur G-Protein-unabhängigen Signalisierung kommen kann. Die Formation von Hetero- oder Homo-Oligomerisierungen mit anderen GPCRs oder auch Proteinen (z.B. receptor activity-modifying proteins, RAMPs) bewirken die Ausbildung so genannter „cross-talks“ zwischen den interagierenden Rezeptoren, was letztendlich zu einem neuen, modifizierten Signaltransduktionsweg führen kann. (Modifiziert nach Bagnol, 2004).

AC, Adenyl-Cyclase; PLC_β, Phospholipase C; Rho, kleine GTPase Rho; NRTK, Rezeptor-unabhängige Tyrosinkinasen

1.2.2.1 Modell der Rezeptoraktivierung

Eine Voraussetzung für die Aktivierung der GPCR ist deren Lokalisation an der Zelloberfläche. Chaperone sowie Chaperon-ähnliche Proteine steuern den mehrstufigen Transportprozess der synthetisierten Rezeptoren vom Zellinneren zur Plasmamembran und regulieren dadurch die Rezeptoranzahl. Neben der Glykosylierung wird auch die Di- und Oligomerisierung GPCR als ein essentieller Schritt der Rezeptorreifung diskutiert. Bei der Internalisierung von Rezeptoren im Anschluss an die Signalisierung nimmt die Phosphorylierung intrazellulärer Domänen des Rezeptormoleküls durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen oder second-messenger-aktivierte Kinasen eine Schlüsselrolle ein. Daraus resultierende Konformationsänderungen des Rezeptors führen zu einer Abschwächung der Signaltransduktion. Des Weiteren kann über die Phosphorylierungsstellen eine Interaktion mit β -Arrestin erfolgen, worüber letztendlich die Internalisierung des Rezeptormoleküls initiiert wird.

In Abhängigkeit von der Größe und Art des Liganden erfolgt die Bindung an den Rezeptor. Größere Liganden, wie beispielsweise Glykoproteinhormone, binden an spezifische Strukturen der extrazellulären Domäne. Wohin gegen sich die Bindungsstelle für kleinere Liganden (z.B. Amine, Nukleotide und einige Lipide) häufig in einer Art Tasche befindet, die von den Transmembrandomänen sowie konservierten Aminosäuren gebildet wird.

Die Bindung eines **Agonisten** an ein Rezeptor-Molekül bewirkt durch die daraus resultierende Konformationsänderung eine Überführung von einem inaktiven in einen funktionell aktiven Zustand und ermöglicht so eine Signaltransduktion. Für einige GPCR konnte gezeigt werden, dass sie sich auch in Abwesenheit eines Agonisten in einem (teil-)aktiven Zustand befinden können, sie sind konstitutiv aktiv. Im Fall des MC4R ist diese Basalaktivität relativ schwach, im Gegensatz zum GHSR, wo sie bis zu 50 % der maximalen Aktivität ausmachen kann (Holst et al., 2003). Diese Beobachtungen zogen eine Erweiterung des ternären Komplexmodells bezüglich der Aktivierung von GPCR von De Lean (1980) nach sich. Dieses Modell beschreibt die Agonisten-induzierte Überführung eines Rezeptors vom inaktiven in den aktiven Zustand, welcher dann die Bindung und Aktivierung eines G-Proteins ermöglicht. Aufgrund der konstitutiven Rezeptoraktivität geht man davon aus, dass sich der Rezeptor in Abwesenheit eines Liganden in einem Gleichgewicht zwischen inaktivem und aktivem Zustand befindet. Die Bindung eines **Agonisten** führt zur Verschiebung des Gleichgewichts in den aktiven Zustand, dagegen verschiebt ein **inverser Agonist** das Gleichgewicht in Richtung des inaktiven Zustandes und hemmt so die Interaktion mit dem G-Protein, was letztendlich in einer Reduktion der Basalaktivität (soweit vorhanden) resultiert. **Antagonisten** hemmen dagegen die Bindung weiterer Liganden, wobei die konstitutive Aktivität des Rezeptor nicht beeinträchtigt wird (Neubig et al., 2003). Neben den

Bindungsstellen für den endogenen Liganden (orthosterische Position) und das interagierende G-Proteine, existieren vermutlich noch andere Positionen, die eine allosterische Regulation des GPCR gewährleisten. Allosterische Modulatoren sind in der Lage indirekt und / oder direkt die Aktivität der orthosterischen Liganden zu regulieren (Christopoulos, 2002; Gilchrist, 2007).

1.2.2.2 G-Proteine

Durch die Bindung des Liganden an seinen Rezeptor ändert das Rezeptormolekül auf der cytoplasmatischen Seite seine Konformation in der Art, dass sich ein G-Protein anlagern kann. Der Austausch des an der α -Untereinheit gebundenen GDPs gegen GTP, hat die Dissoziation des G-Proteins in α -Untereinheit und $\beta\gamma$ -Untereinheit zur Folge, die über jeweils unabhängige Kapazitäten der Signaltransduktion verfügen. Durch langsame enzymatische Hydrolyse des GTP zu GDP kehrt die α -Einheit in den inaktiven Zustand zurück und verbindet sich wieder mit dem $\beta\gamma$ -Komplex. Damit wird der Ausgangszustand wieder hergestellt und Weiterleitung des extrazellulären Signals terminiert.

Heterotrimere G-Proteine, bestehend aus einer α -Untereinheit, welche die Guaninnukleotide-Bindungsstelle trägt, und dem Dimer-Komplex aus der β - und γ -Untereinheit, werden durch die Bindung an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptors aktiviert. Die Aktivierung mehrerer G-Protein-Moleküle durch ein Molekül eines GPCR bewirkt eine Signalverstärkung (Alousi et al., 1991). Anhand der α -Untereinheit, die zur Superfamilie der GTP-hydrolysierenden Enzyme (GTPasen) gehört, werden die G-Proteine funktionell unterteilt. Die Proteine der $G_{s/i}$ -Familie stimulieren bzw. inhibieren die Adenylat-Cyclase und beeinflussen darüber den intrazellulären Spiegel des sekundären Botenstoffes cAMP. Eine weitere Gruppe stellen die Proteine der G_q -Familie dar, sie bedingen eine Stimulation der Phospholipase C (PLC), welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in die sekundären Botenstoffe IP_3 und DAG spaltet. Die letzte Gruppe umfasst die Familie der $G_{12/13}$ -Proteine, über die noch wenig bekannt ist. Die Regulation der Aktivität verschiedener Enzymen (Adenylat-Cyclase oder Phospholipase C) erfolgt nicht nur über die α -Untereinheit, viele Effekte werden auch über den aktivierten $\beta\gamma$ -Komplexes vermittelt (Clapham & Neer, 1997).

Neben der Aktivierung von G-Proteinen im Rahmen der Vermittlung endokriner Signale steuern einige GPCR auch G-Protein-unabhängige alternative Signaltransduktionswege (z.B. die Frizzled-Rezeptoren).

1.2.3 Di- und Oligomerisierung GPCR

Agnati und Mitarbeiter formulierten 1980 erstmals die Möglichkeit der Dimerisierung von GPCR und erweiterten so das bis dahin vorherrschende Bild von einem lineare Regulationssystem, worin ein Rezeptor, der von einem einzelnes Gen kodiert und durch die Bindung seines spezifischen Liganden aktiviert wird. Das die Bildung von Dimeren (als kleinste Form der Oligomerisierung) eine komplexe Rezeptor-Liganden-Beziehung realisiert wurde erstmals am Beispiel der Opioid-Rezeptoren δ , κ und μ gezeigt werden (Waldhoer et al., 2005; Gomes et al., 2004; Jordan & Devin, 1999; George et al., 2000). Arbeiten zum GABA_B Rezeptor konnten zeigen, dass die Dimerisierung auch für die physiologische Funktion von GPCR wichtig ist (White et al., 1998). Der GABA_B Rezeptor setzt sich aus zwei Rezeptoreinheiten GABA_{B1} und GABA_{B2} zusammen, die gemeinsam die Funktionsfähigkeit gewährleisten. GABA_{B1} sorgt für die Bindung des Liganden, wohin gegen GABA_{B2} für den Transport von GABA_{B1} zur Plasmamembran und die Aktivierung des G-Proteins notwendig ist (Pin et al., 2005). Die umfassenden Daten zur Heterodimerisierung des EP₁R (Prostaglandinrezeptor E) und β_2 AR (β_2 -adrenerge Rezeptor) in Zellen der glatten Muskulatur machten deutlich, dass die Dimerisierung von GPCR neue therapeutische Ansatzpunkte bei der Behandlung von Krankheiten wie Asthma liefern (McGraw et al., 2006, Barnes, 2006). Die Homo- und Hetero – sowie Oligomerisierung von GPCR wird heute weitestgehend akzeptiert (Bouvier, 2001; Angers et al., 2002; George et al., 2002), wohin gegen die Konsequenzen für die Funktionalität der Rezeptoren noch nicht vollständig geklärt ist. Als mögliche Funktionen der Dimerisierung werden die Diversifizierung der Rezeptorpharmakologie, eine Feinabstimmung der Ligandenbindung und G-Protein-Spezifität sowie die Regulation der Rezeptorreifung und Internalisierung diskutiert (Terrillon & Bouvier, 2004; Jacoby et al., 2006; siehe Abb. 6).

Eine Übersicht über die Analyse verschiedener Heterodimere wurde beispielsweise von Kroeger et al. (2004) aufgestellt. Die Ergebnisse mehrerer Dimerisierungsstudien (Maamra et al., 2006; Cogé et al., 1999; Lee et al., 2000) hinsichtlich der Zelloberflächenexpression verschiedener GPCRs machen deutlich, dass bereits auf einer frühen Ebene der Proteinbiosynthese, vermutlich im endoplasmatischen Reticulum, die Dimerisierung einen wichtigen Schritt der Proteinreifung darstellen kann (Terrillon & Bouvier, 2004). Offensichtlich hat auch die Ligandenbindung an der Zelloberfläche einen Einfluß auf Grad und Regulation der Dimerisierung von GPCRs. An der Ausbildung von Oligomerenstrukturen können teilweise auch intra- und extrazelluläre lösliche und Transmembranproteine beteiligt sein (Schwartz & Blobel, 2003).

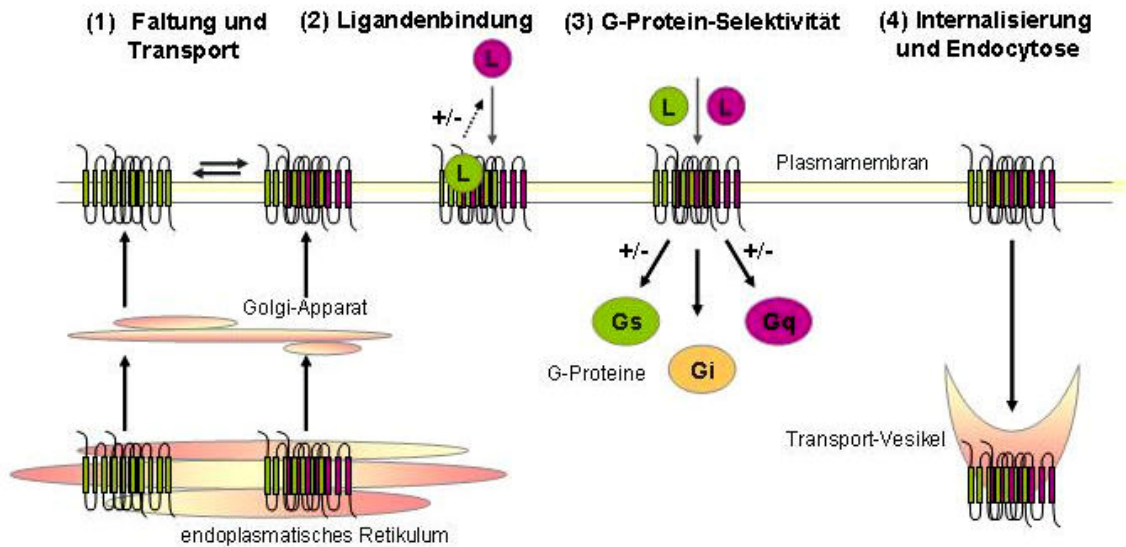


Abbildung 6: Potentielle Funktionen der Dimerisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (nach Terrillon & Bouvier, 2004)

Die molekularen Mechanismen der GPCR-Dimerisierung sind bislang nur teilweise aufgeklärt. Die Diversität der bisher publizierten Daten lässt vermuten, dass es kein einheitliches Prinzip für die Interaktion von GPCRs gibt. Selbst innerhalb der engverwandten Opioid-Rezeptoren δ , κ und μ scheinen unterschiedliche Domänen für die Dimerisierung von Bedeutung zu sein (Filizola et al., 2002). Generell nimmt man an, dass zum einen Disulfidbrücken (z.B. beim Calcium-sensing Rezeptor) oder aber Interaktionen zwischen den Transmembrandomänen beteiligt sind. Die momentan diskutierten Dimerisierungsmodelle basieren auf letzterem. Das Modell der Kontakt-Dimere beschreibt Interaktionen zwischen den einzelnen Transmembrandomänen, wobei die enge Packung innerhalb der Plasmamembrane nicht verändert wird. Ein Austausch von Transmembrandomänen zwischen den Rezeptormolekülen des Dimers steht im Mittelpunkt des Modells des Domänen-übergreifenden Dimers.

Ein mittlerweile größer werdendes Spektrum an Methoden ermöglicht eine umfangreiche Untersuchung der Dimerisierungseigenschaften von GPCRs. Neben den klassischen biochemischen Analysen (Immunoblotting und Koimmunopräzipitation differentiell epitopmarkierter GPCRs) bieten FRET-(fluorescence resonance energy transfer) und BRET-(bioluminescence resonance energy transfer) Experimente die Möglichkeit, die Interaktion von unterschiedlich markierten und koexprimierten Rezeptoren in lebenden Zellen zu charakterisieren (Kroeger et al., 2004; Milligan et al., 2005).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Angesichts der stetig steigenden Prävalenz der Adipositas, die teilweise epidemische Ausmaße erreicht, werden medikamentöse Therapien immer notwendiger. Dies setzt das Verständnis der vielfältigen Wechselwirkungen von orexigenen und anorexigenen Effektorsystemen voraus. Die beiden Melanocortin-Rezeptoren 3 und 4 sind wichtige Kontrollelemente der hypothalamischen Appetitregulation und stellen als solche interessante Ansatzpunkte für die pharmakologische Adipositas-Forschung dar. Der MC4R ist an der Vermittlung des anorexigenen Effektes des peripheren Hormons Leptin beteiligt, er beeinflusst Mahlzeitengröße, Nahrungswahl und Energieverbrauch (Adan et al., 2006). Der MC3R stellt durch seine Lokalisation auf den NPY/AgRP-Neuronen (orexigenes System) im ARC und die Stimulation durch anorexigenen Neuropeptiden (α -, β - und γ -MSH) eine Verbindung zwischen den antagonistischen Regulationssystemen im Hypothalamus her. Die Zugehörigkeit der beiden Melanocortin-Rezeptoren zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren eröffnet hinsichtlich der Signaltransduktion ein komplexes Regulationssystem. Vielfach konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung verschiedener GPCRs einen wesentlichen Einfluß auf die Rezeptorfunktion hat (Bouvier, 2001; George et al., 2002; Jacoby et al., 2006; Terillon et al., 2004).

Ziel dieser Arbeit war es daher Interaktionspartner zu finden, die entweder mit dem MC3R im ARC oder dem MC4R im PVN koexprimiert werden und nachweislich die Appetit- und Gewichtregulation beeinflussen. Für die Untersuchung der Dimerisierungseigenschaften der heterolog exprimierten GPCRs sollen zwei unterschiedliche experimentelle Strategien verfolgt werden. Zum einen der Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Säugerzellen anhand von FRET (Fluoreszenz-Energie-Transfer) und zum anderen der biochemische Nachweis von Rezeptor-Dimeren über unterschiedliche N- bzw. C-terminale Epitopmarkierungen (Sandwich-ELISA). Dies setzt die Etablierung der FRET-Methode voraus, da bisher nur der Sandwich-ELISA in unserer Arbeitsgruppe für Interaktionsstudien erfolgreich genutzt wird.

Darüber hinaus sollen die nachgewiesenen Heterodimere funktionell charakterisiert werden. Der Fokus liegt dabei auf den Auswirkungen der Rezeptorinteraktion hinsichtlich des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweg, der sowohl durch die Stimulation des MC4R als auch des MC3R aktiviert wird.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Anti-Flag-M2-Antikörper, monoklonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Hämagglutinin (HA)-Biotin-Konjugat	Roche, Mannheim
Streptavidin-Peroxidase (POD)-Konjugat	Dianova, Hamburg

2.1.2 Antibiotika

Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.3 Enzyme

T4-DNA- Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
Taq-DNA-Polymerase	Bioline, London, UK
DNaseI (RNase-Free)	New England Biolabs, Schwalbach
Shrimps Alkaline Phosphatase	usb, Ohio, Cleveland, USA
Restriktionsendonukleasen <i>AatI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>KpnI</i> , <i>PstI</i> und <i>SpeI</i>	New England Biolabs, Schwalbach

2.1.4 Hormone

NDP- α -MSH	Peter Henklein, Biochemie Charité
α -, β - und γ -MSH	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ghrelin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.5 Inhibitoren

Pertussistoxin (PTX)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
U-73122	Calbiochem
N-(6-Aminohexyl)-5-naphthalenesulfonamide hydrochloridechloro-1 (W7)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.6 Radioaktive Substanzen

^{125}I -NDP- α -MSH	2000 Ci/mmol; Amersham Pharmacia, Little Chalfont, England
--------------------------------------	--

2.2 Medien und Puffer

2.2.1 Medium für Bakterienkulturen

LB-Flüssigmedium

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l
in H ₂ O; pH 7,4	

LB-Agarplatten

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l
Agar-Agar	1,5 % (w/v)

SOB-Medium

Trypton	20 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	0,5 g/l
KCl	2,5 mM
in H ₂ O; pH 7,4	

SOC-Medium

MgCl ₂ (sterilfiltriert)	20 mM
Glucose (sterilfiltriert)	20 mM
in hitzesterilisiertem SOB-Medium	

Die Antibiotika wurden den hitzesterilisierten Medien in einer Endkonzentration von 75 µg/ml (Ampicilin) oder 50 µg/ml (Kanamycin) zugesetzt.

2.2.2 Medien für die Zellkultur

PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)–Dulbecco ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ (Biochrom, Berlin)

(A) Transfektionsmedien

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom, Berlin
MEM Earle's-Medium	Biochrom, Berlin

(B) Vollmedien

DMEM- bzw. MEM Earle's-Medium versetzt mit jeweils:

Fötales Kälberserum (FKS)	10 %
L-Glutamin	10 %
Penicilin	100 U/ml
Streptomycin	100 U/ml

2.2.3 Puffer für Fluoreszenz Imaging (Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie und FRET)

HBS-Puffer

NaCl	28 mM
KCl	6 mM
MgCl ₂	1 mM
HEPES	10 mM
Glucose	5,5 mM
BSA	0,2 %
CaCl ₂	1 mM
in H ₂ O; pH 7,4 mit NaOH	

2.2.4 Puffer für Oberflächenbindung

HANK's Lösung (Oberflächenbindungspuffer)

KCL	5,36 mM
KH ₂ PO ₄	0,44 mM
MgSO ₄	0,40 mM
Na ₂ HPO ₄	0,33 mM
Glucose	5,55 mM
CaCl ₂	1,30 mM
Sucrose	280 mM
BSA	0,2 %
Magermilchpulver	2,5 %
pH 7,4	

2.2.5 Puffer für cAMP-Akkumulationspuffer

Stimulationspuffer

HEPES, pH 7,4	20 mM
NaCl	138 mM
KCl	6 mM
MgCl ₂	1 mM
Glucose	5,5 mM
CaCl ₂	1 mM
BSA	0,1 %
auf 1l	

Lysispuffer

HEPES, pH 7,4	5 mM
BSA	0,1 %
Tween	0,3 %
IBMX	1 mM

SO-Puffer

Hank's Balanced Salt Solution	1 x
(HBSS; Gibico, Invitrogen, Karlsruhe)	
HEPES, pH 7,4	5 mM
BSA	0,1 %

2.2.6 Puffer für Oberflächen und Sandwich ELISA

Substratpuffer

Citronsäure	0,1 M
Na ₂ HPO ₄	0,1 M
pH 5,2	

Substratlösung

Substratpuffer	25 ml
o-Phenyldiamin	10 mg
H ₂ O ₂ (30 %)	20 µl

Stopplösung

HCl	1 M
Na ₂ SO ₃	0,05 M

PBS (1x)

NaCl	150 mM
Na ₂ HPO ₄	0,1 M
KH ₂ PO ₄	1,6 mM
pH 7,4	

Lysispuffer

Tris/HCL	10 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
Desoxycholat-Na	1 %
NP-40	1 %
PMSF	0,2 mM
in H ₂ O	

Beschichtungspuffer

Natriumtetraborat	150 mM
in H ₂ O ₂ ; pH 8,0	

PBS-T

PBS + 0,05 % Triton-X-100

2.3 Molekularbiologische Methoden

Weit verbreitete molekularbiologische Methoden wie der Verdau von DNA durch Restriktionsenzyme, die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Ligation wurden bei der Anfertigung dieser Arbeit verwendet. Ihre Durchführung ist detailliert im Buch „Molecular Cloning“ von Sambroock & Russel (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001) beschrieben, ihre Einbettung in Klonierungsstrategien wird im Folgenden dargelegt. Die Herstellung und Transfektion von chemisch kompetenten Zellen, DNA-Aufreinigungen, die Herstellung von cDNA, RNA-Isolationen und TOPO-Klonierungen erfolgten nach den Angaben der jeweiligen Hersteller.

Molekularbiologische Routinemethoden

Agarosegelelektrophorese	Aaja und Borst, 1972
Herstellung chemisch kompetenter Zellen	Invitrogen, Karlsruhe
Ligation von DNA-Fragmenten	Sambrook et al., 2001
Plasmidpräparation über DNA-bindende Säulen	Qiagen, Hilde
Restriktion von DNA-Fragmenten	Sambrook et al., 2001
RNA-Isolation aus Säugerzellen	Invitrogen, Karlsruhe
RT-PCR	Qiagen, Hilde
Sequenzierung	Sanger et al., 1977
Transformation von <i>E.coli</i> -Zellen	Cohen et al., 1972

2.3.1 Klonierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der hypothalamischen Appetitregulation

Für die heterologe Expression der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in Säugerzellen wurden zwei unterschiedliche Expressionsplasmide genutzt:

- | | |
|---------------------------|---|
| (1) hcpcDPS | von Prof. Dr. Torsten Schöneberg, Institut für Biochemie, Universität Leipzig |
| (2) pECFP-N1 und pEYFP-N1 | Clontech, Paolo Alto, Ca, USA (siehe Abb. 7) |

Die für die verwendeten humanen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren kodierende cDNA stammt aus bereits angefertigten Expressionsplasmiden (Patrick Tarnow und Annika Bickenbach, Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie, Virchow Klinikum Berlin).

Alle hergestellten Konstrukte wurden auf ihre Identität und Korrektheit durch Sequenzierung der cDNA mit einem Kapillarsequencer ABI3130x/ Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA) überprüft.

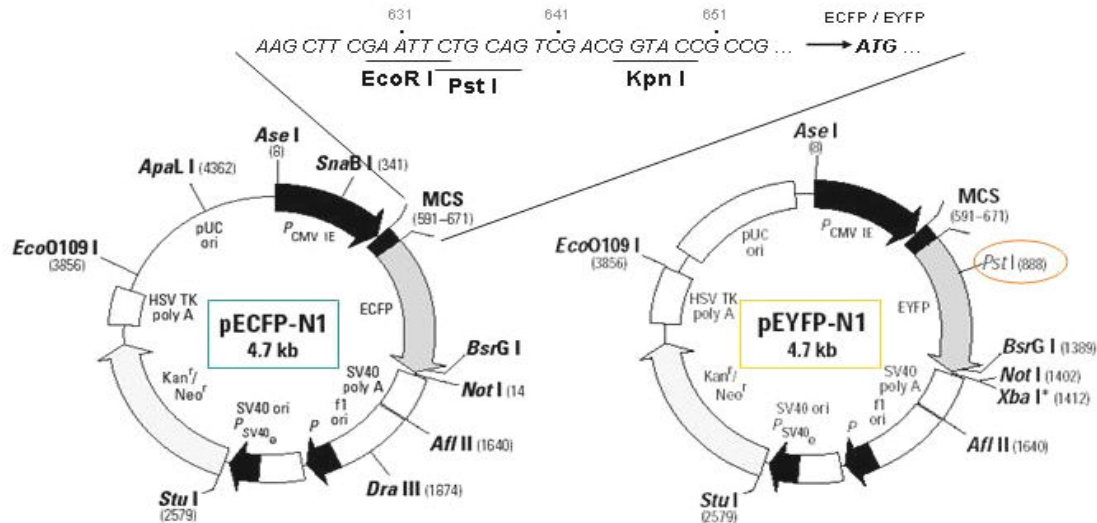


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Expressionsplasmide pECFP-N1 (rechts) und pEYFP-N1 (links).

Das Expressionsplasmid verfügt über: einen Promotor des humanen Cytomegalievirus (P_{CMV}), den offenen Leserahmen für das cyan bzw. das gelb fluoreszierende Protein (ECFP bzw. EYFP), eine nachgeschaltete Polyadenylierungssequenz (SV40 polyA) und ein Kanamycin- und ein Neomycin-Resistenzgen (Kan^r/Neo^r), das durch den SV40-Promotor angetrieben wird (SV40 ori, P_{SV40}), einen f1 Einzelstrang DNA-Ursprung (f1 ori), der den nicht-kodierenden CFP- bzw. YFP-Strang verpackt, sowie ein Polyadenylierungssignal der Thymidinkinase aus dem Herpes simplex Virus (HSV TK polyA) und einen Plasmid-Replikationsursprung (pUC). (Referenz: Clontech)

2.3.1.1 Generierung von HA- und Flag-Epitop-markierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Zur Untersuchung der Oberflächenexpression und der Rezeptordimerisierung wurden unter anderem Immunoassays durchgeführt. Um eine immunologische Detektion der Rezeptoren durchführen zu können, war eine Epitopmarkierung erforderlich. So wurden die Konstrukte mit N-terminalen HA-Epitopen und / oder C-terminalen Flag-Epitopen versehen. Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Epitope die Aktivität der Rezeptoren nicht beeinträchtigt. Daher wurden diese Expressionsplasmide auch für die Ligandenbindungsstudien eingesetzt.

Bei dem HA-Epitop handelt es sich um eine Nukleotidsequenz, die für die Aminosäuresequenz YPYDVPDA kodiert und aus dem Hämagglutinin-Protein des Influenzavirus stammt. Das Flag-Epitop weist die Aminosäuresequenz DYKDDDDK auf. Beide Epitope sind mit kommerziell erhältlichen Antikörpern detektierbar.

Hergestellt wurden diese HA- oder Flag-markierten Rezeptoren von Patrick Tarnow und Annika Bickenbach (Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie, Virchow Klinikum Berlin). Die Markierung erfolgte mittels spezifischer Primer im Rahmen einer PCR. Die so synthetisierten Fragmente wurden über die beiden Restriktionsschnittstellen *AatII* und *SpeI* (N-terminales HA-

Tabelle 3: Oligonukleotidsequenzen für die Konstruktion der CFP- und YFP-Epitop markierten humanen Appetit Rezeptoren MC3R, MC4R, CB1R, GHSR, hGPR7, Nmu2R, NPY2R und μ -OPR

Name des Rezeptors	Oligonukleotid	Klonierungs-enzyme
MC3R	MC3REcoFP-F 5' GCT TCG <u>AAT TCT</u> GAT GAG CAT CCA AAA GAC 3' MC3RKpnFP-R 5' <u>CGG TAC CGT</u> CGA TCC CAA GTT CAT GCC G 3'	EcoRI / KpnI
MC4R	MC4REcoFP-F 5' GCT TCG <u>AAT TCT</u> GAT GGT GAA CTC C 3' MC4RKpnFP-R 5' <u>CGG TAC CGT</u> CGA ATA TCT GCT AGA C 3'	EcoRI / KpnI
CB1R	CB1EcoFP-F 5' GCT TCG <u>AAT TCT</u> GAT GAA GTC GAT CCT AG 3' CB1KpnFP-R 5' <u>CGG TAC CGT</u> CGA AGC CTC GGC AGA CGT G 3'	EcoRI / KpnI
GHSR	GHSR1EcoFP-F 5' GCT TCG <u>AAT TCT</u> GAT GTG GAA CGC GAC GC 3' GHSR1KpnFP-R 5' <u>CGG TAC CGT</u> CGA TGT ATT AAT ACT AGA TTC 3'	EcoRI / KpnI
hGPR7	hGPR7EcoFP-F 5' GCT TCG <u>AAT TCT</u> GAT GGA CAA CGC CTC G 3' hGPR7KpnFP-R 5' <u>CGG TAC CGT</u> CGA GGC TGC CGC GCG 3'	EcoRI / KpnI
NPY2R	NPY2REcoFP-F 5' GCT TCG <u>AAT TCT</u> GAT GGG TCC AAT AGG TG 3'	EcoRI / KpnI

μ-OPR	<p>NPY2RKpnFP-R 5' <u>CGG TAC CGT</u> <i>CGA</i> GAC ATT GGT AGC CTC 3'</p> <p>μ-OPRPstFP-F 5' CGA ATT <u>CTG CAG</u> <i>ATG</i> GAC AGC AGC GC 3'</p> <p>μ-OPRKpnFP-R 5' <u>CGG TAC CGT</u> <i>CGA</i> GGG CAA CGG AGC AG 3'</p>	PstI / KpnI
--------------	--	-------------

Die eingefügten Restriktionsschnittstellen für die Klonierung sind unterstrichen. Das jeweilige Startcodon sowie das modifizierte Stopcodon der verwendeten Rezeptoren sind kursiv.

(a) C-terminale Flag-Markierung

Für cAMP-Akkumulationsassays wurden die YFP-Fusionsrezeptoren modifiziert, da die verhältnismäßig großen Fluoreszenzmoleküle am C-Terminus die durch die Aktivierung des Rezeptors initiierte Bindung spezifischer G-Proteine möglicherweise behindern könnten und somit einen negativen Einfluß auf die Signaltransduktion hätten.

Dafür war zunächst ein kompletter Verdau des YFP-fusionierten Expressionsplasmides mit *KpnI* notwendig. Die entsprechende Restriktionsschnittstelle befindet sich am 3'Ende des Inserts im Fusionsübergang zum YFP. Anschließend wurde der linearisierte Vektor noch dephosphoryliert (1U/μl Shrimps Alkaline Phosphatase, usb, Cleveland, Ohio, USA). Ein DNA-Fragment, welches das Flag-Epitop (DYKDDDDK) einschließlich eines eigenen Stopcodons am 3'-Ende kodiert wurde aus einem kodierenden (sense) und einem dazu komplementären (antisense) Einzelstrang zusammengesetzt. Über die *KpnI*-Schnittstelle am jeweiligen phosphorylierten 5'Ende der beiden Oligonukleotide konnte das Flag-kodierende Fragment direkt für die Ligation mit dem geschnittenen Expressionsplasmid verwendet werden. Eine entsprechende grafische Darstellung dieser Klonierungsstrategie ist in der Abb. 8 zusammengefasst.

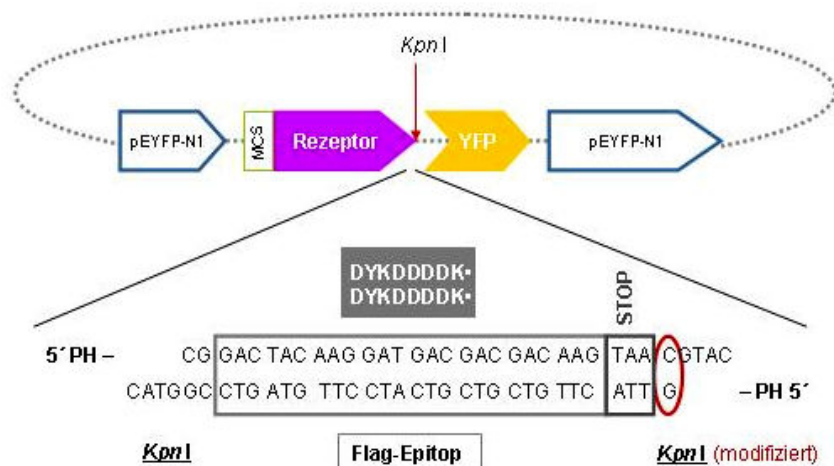


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die Modifizierung der YFP-Fusionsplasmide

Die bereits bestehenden YFP-Expressionsplasmide (pEYFP-N1) der untersuchten Appetitrezeptoren wurde durch einen Restriktionsverdau mit *KpnI* zunächst linearisiert. Anstelle des YFP-Epitops wurde dann an das 3'-Ende der Rezeptor-cDNA eine Flag-Markierung kloniert. Da am 3'-Ende des Flag-Epitops ein zusätzliches Stopcodon angehängt wurde bricht die Synthese des Proteins vor dem YFP-Epitop ab. Es entsteht ein neues Fusionsprotein bestehend aus dem Rezeptor und dem C-terminalen Flag-Epitop.

(b) Herstellung trunkierter MC4R-Konstrukte

Die C-terminale Verkürzung von MC4R erfolgte mittels PCR generiert, wobei an den Enden der cDNA durch die Vorwärtsprimer eine *EcoRI*-Schnittstelle und mit den jeweiligen Rückwärts-Primern eine *KpnI*-Schnittstelle für die Umklonierung in die Fusionsvektoren pECFP- und pEYFP-N1 eingefügt wurde (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Oligonukleotide für die Herstellung der trunkierten MC4R-Konstrukte

Name	Oligonukleotidsequenz	Klonierungsenzyme
MC4R TM3-Fw	5' GCT TCG <u>AAT TCT</u> GAT 3'	<i>EcoRI</i>
MC4R TM3-Rv	5' <u>CGG TAC CGT</u> CGA AAC TGT CAT AAT GTT ATG 3'	<i>KpnI</i>
MC4R TM5-Fw	5' GCT TCG <u>AAT TCT</u> GAT 3'	<i>EcoRI</i>
MC4R TM5-Rv	5' <u>CGG TAC CGT</u> CGA TCC CTT CAT ATT GG 3'	<i>KpnI</i>

Die eingefügten Restriktionsschnittstellen für die Klonierung sind unterstrichen.

2.3.1.3 Herstellung der MC3R-Mutante I183N sowie der GHSR-Mutanten A204E und F279L

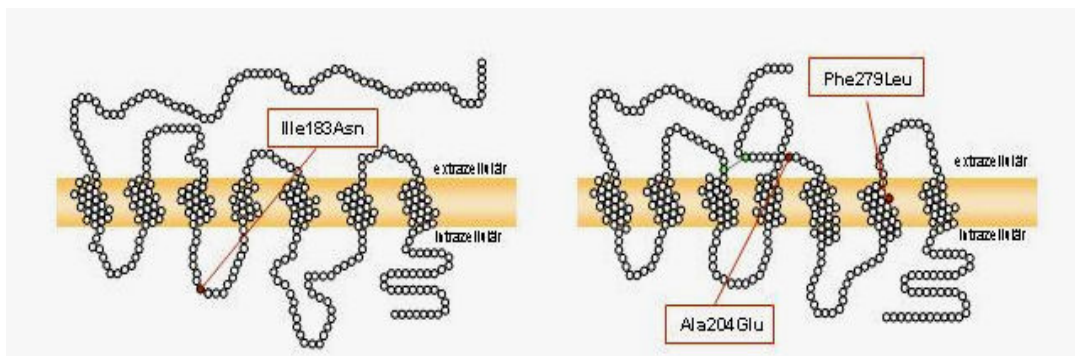


Abbildung 9: Lage der generierten Mutationen MC3R I183N (rechts) sowie GHSR A204E und F279L (links)

Darstellung der transmembranären Regionen des MC3R (rechte Seite) und des GHSR (linke Seite), die durch gerichtete Mutagenese eingebauten Mutationen sind rot markiert. Die Numerierung der Nukleotide und Aminosäuren erfolgte für MC3R nach Rached und Mitarbeiter (Rached et al., 2004) sowie für GHSR nach Holst und Schwartz (Holst and Schwartz, 2006).

Zur Synthese der Rezeptormutanten (siehe Abb. 9) wurde die überlappende Polymerase Kettenreaktion (overlap extension PCR) verwendet, bei der das Produkt einer ersten Amplifikation bzw. ein Gemisch aus Fragmenten als Template für eine zweite PCR eingesetzt werden. Hierfür wurden die Oligonukleotid-Primerpaare für die erste PCR so ausgewählt, dass jeweils zwei überlappende Fragmente amplifiziert wurden, die sowohl die gewünschte Mutation als auch eine spezifische Klonierungsstelle beinhalteten. In einer zweiten PCR wurden diese Fragmente als Ausgangsmaterial eingesetzt, amplifiziert wurde mit den äußeren Oligonukleotiden (siehe Abb. 10). Das so entstandene PCR-Produkt wurde zunächst nach Herstellerangaben in einen TA-„cloning“-Vektor (pCR® 2.1-TOPO TA Cloning® Kit, Invitrogen, Karlsruhe) kloniert um nach der Transformation in *E.coli* (*Eschericia coli*-Stamm DH5α) mittels Blau-Weiß-Selektion einige Klone auszuwählen, die für die Sequenzierung angezogen und nach der Plasmidisolation (Minipräparationssystem von Qiagen, Hilden) überprüft wurden. Konnte mittels Sequenzierung (Kapillarsequencer ABI3130x/ Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA) ein Klon identifiziert werden, der neben der gewünschten Mutation keine weitere trug, so wurde die DNA dieses Klonen mit den Klonierungsenzymen geschnitten und in den Expressionsvektor pECFP- N1 bzw. pEYFP-N1 (Clontech, Heidelberg) ligiert. Nach erfolgreicher Transformation in *E.coli* wurden die entstandenen Klone noch einmal durch Sequenzierung überprüft. Die für die funktionelle Charakterisierung ausgewählten Klone wurden angezogen, um größere Mengen der Plasmid-DNA mit Hilfe von DNA-bindenden Säulen (Qiagen, Hilden oder Macherey-Nagel, Düren) für die transiente Transfektion der Säugerzellen zu gewinnen.

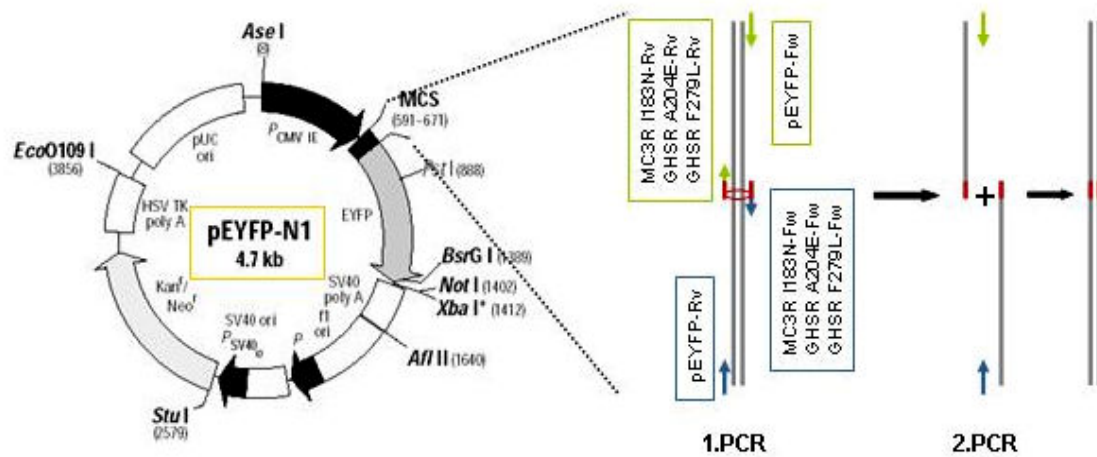


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Generierung der MC3R- und GHSR-Mutanten mittels overlap extension PCR

Als Ausgangsmaterial für die Generierung der Rezeptormutanten wurden die bereits bestehenden Expressionsplasmide pEYFP-N1 mit der MC3R- und GHSR-Wildtyp-cDNA verwendet. Zunächst werden Fragmente der Wildtyp-Rezeptor-Sequenzen mit Hilfe von zwei spezifischen Primerpaaren (hier in Form von grünen und blauen Pfeilen dargestellt) amplifiziert. Dabei wurde jeweils ein Oligonukleotid so ausgewählt, das es zu einem gerichteten Basenaustausch im neu synthetisierten Strang kommt (Mutagenese als rotes Oval angegeben). Die beiden komplementären Fragmente überlappen im Bereich der Mutagenese. In der anschließenden (overlap extension) PCR erfolgt eine Verknüpfung der beiden Fragmente über den Überhang, so dass über die äußeren Primer (pEYFP-Fw und pEYFP-Rv) die Einzelstränge zum Doppelstrang aufgefüllt wurden.

Tabelle 5: Oligonukleotide für die Herstellung der Mutanten. Die mutierten Basen sind klein und kursiv geschrieben.

Name	Oligonukleotidsequenz
pEYFP-Fw	5' GTC GTA ACA ACT CCG CCC CAT TGA C 3'
pEYFP-Rv	5' GGG TCA GCT TGC CGT AGG TGG 3'
MC3R I183N-Fw	5' CAG GTA CGT CAC CA ^a CTT TTA CGC GCT CCG 3'
MC3R I183N-Rv	5' CGG AGC GCG TAA AAG ^t TG GTG ACG TAC CTG 3'
GHSR A204E-Fw	5' CAC CGA GTT TG ^a GGT GCG CTC TGG 3'
GHSR A204E-Rv	5' CCA GAG CGC ACC ^t CA AAC TCG GTG 3'
GHSR F279L-Fw	5' CTG GCT CCC CTT ^a CA CGT AGG GCG 3'
GHSR F279L-Rv	5' CGC CCT ACG TG ^t AAG GGG AGC CAG 3'

Die Herstellungsstrategie für die Mutanten MC3R I183N, GHSR A204E und GHSR F279L ist der Abb. 10 zu entnehmen. Die dafür verwendeten Oligonukleotide sind in der Tabelle 5 zusammengefasst.

2.3.2 RT-PCR

Zum analytischen Nachweis der Adenylat-Cyclasen (Isoformen 1-8) in COS-7-Zellen wurde die Expression der Enzyme auf Transkriptionsebene durch die Anwendung der Polymerasekettenreaktion nachgewiesen. Zur Amplifikation der Adenylat Cyclasen mittels PCR wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Primer verwendet.

Die für die RNA-Präparation verwendeten COS-7-Zellen wurden wie unter 2.4.1 beschrieben kultiviert. Die mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelösten Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend entsprechend den Angaben des Herstellers in 1mL Trizol® Reagent (Invitrogen, Karlsruhe) aufgenommen. Die RNA-Isolation wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurde eine DNase-Behandlung (2 U/10 µg RNA DNaseI, New England Biolabs, Schwalbach der Proben vorgenommen, um Kontaminationen zu vermeiden und um auszuschließen, dass die später amplifizierten PCR-Produkte genomischen Ursprungs waren. Für die reverse Transkription in cDNA wurde ein Oligo-dT-Primer (Invitrogen, Karlsruhe) sowie der Omniscript® RT Kit (Qiagen, Hilde) verwendet. In der nachfolgenden PCR wurde jeweils ein Fragment von ca.360 bp amplifiziert. Die isolierten und gereinigten PCR-Produkte (Qiagen, Hilde oder Promega, Mannheim) wurden in einen pCR2.1-TOPO Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben kloniert. Es wurden pro Enzym 4-5 Klone sequenziert.

Tabelle 6: Oligonukleotidsequenzen für den analytischen Nachweis der Adenylat-Cyclasen

Name	Oligonukleotidsequenz
AC1-Fw	5' GGC AGC TCC TTT TGG TCA CCT TCG 3'
AC1-Rv	5' GCT CAC ATT GTC GTC CCT CTG GAT G 3'
AC2-Fw	5' CTC TTC ATC ATC TTC GTG TTG TAC ACC ATG 3'
AC2-Rv	5' GTT GTG GAA GTT ATT TGT GTT CTC CAT CTG 3'
AC3-Fw	5' GGA CAT CAT CCT CTT CGT GCT CTG C 3'
AC3-Rv	5' CCA GGA AGG CCT TGC GGT GC 3'
AC4-Fw	5' GGA CCA GGT GTC CTA TTT TCT CTT CG 3'
AC4-Rv	5' CTC TCT GGC CGT GAC CCC TG 3'
AC5-FW	5' GCA GCG GCG GGG CGC 3'
AC5-RV	5' CAT GAC CAG GCA CAC GAG CAC C 3'
AC6-Fw	5' CTG CTG GCG CCG TCT GGT G 3'
AC6-RV	5' GCG GAT GGG GAG GAG CGT G 3'
AC7-Fw	5' CCC TTC AGC ATG CGG GGC G 3'
AC7-Rv	5' GAT GCT GAC ATT CTG GTG CCT CTT G 3'

AC8-Fw	5' GCC AGC GGC AGC GGA GG 3'
AC8-Rv	5' GAT CTG GGT GGT CAT GGC CAC C 3'

2.4 Zellbiologische Methoden

Zur Untersuchung der Interaktion von humanen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Appetittregulation wurden eukaryoten Zellen für die heterologe Expression genutzt, da diese im Gegensatz zur Expression in *E.coli* die co- und posttranslationale Prozessierung dieser Proteine sowie deren korrekte Lokalisation in der Zellmembran gewährleisten.

Um insbesondere den Einfluß der Heterodimerisierung auf den cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweg sowie die Bindung einzelner Liganden an Rezeptordimere und die Oberflächenexpression nach der Koexpression von Rezeptorpaaren zu untersuchen, wurden ebenfalls Säugerzellen als Modellsystem genutzt.

2.4.1 Zelllinien und Kultivierung

COS-7 Zellen (Abkürzung von CV1 Origin SV40) sind modifizierte renale Epithelzellen, die aus der Niere einer afrikanischen Grünen Meerkatze (*Cercopithecus Aethiops*) stammt. Die Zellen wurden mit DNA des SV40-Virus transformiert, die eine funktionsfähige frühe Genregion, aber einen defekten viralen Replikationsursprung aufweist. Die in das Wirtsgenom eingebaute DNA kodiert für das T4-Antigen (large T-Antigen). Die Virus-DNA kann sich aufgrund des fehlenden Replikationsursprungs nicht selbständig replizieren. Will man diese Zellen transfizieren, um ein bestimmtes Protein von diesen Zellen synthetisieren zu lassen, muß das Expressionsplasmid den fehlenden Replikationsursprung liefern. Vektoren mit einem entsprechenden SV-40-Promotor gewährleisten eine Überexpression des Insert im COS-7-Zellsystem. Gegenüber anderen eukaryotischen Systemen lassen sich diese Zellen effizient transfizieren. Darüber hinaus zeigen sie meist eine hohe Expressionsrate und können leicht in großen Mengen kultiviert werden. Zur Kultivierung dieser adhären Zellen wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Biochrom, Berlin) mit 10 % FCS, L-Glutamin sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin verwendet. Die Zellen wurden in Brutschränken mit einer feuchten Atmosphäre bei 37°C und einer zusätzlicher Begasung mit 5 % CO₂ angezogen.

HEK293-Zellen sind ein Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle (**H**uman **E**mbryonic **K**idney). Die hypotriploiden Epithelzellen wurden in MEM Earle's-Medium (Biochrom, Berlin) mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin in 5 %-CO₂-

begasten Brutschränken in feuchter Atmosphäre bei 37°C kultiviert. Diese Zelllinie wurde vor allem für die konfokale Laser- Scanning-Mikroskopie und die FRET-Messungen verwendet, da sie eine kleinere Zellgröße aufweisen als COS-7-Zellen und man somit mehr Zellen pro Aufnahme bzw. Messung erfasst. Alle hier dargelegten mikroskopischen Arbeiten wurden am Institut für Pharmakologie an der Freien Universität Berlin durchgeführt. Da die HEK293-Zellen nur schwach adhärent wachsen, wurden sie für den Transport auf Glasplättchen ausgesetzt, die mit Poly-L-Lysin (Biochrom, Berlin) beschichtet wurden

Alle zwei bis drei Tage wurden sowohl die HEK293-Zellen als auch die COS-7-Zellen 1:10 umgesetzt. Zum Passagieren und Aussetzen in entsprechenden Kulturplatten wurden die Zellen ca. drei Minuten bei 37°C mit Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom, Berlin) inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden dann in frischem Medium aufgenommen, verdünnt und in die entsprechenden Gefäße überführt.

2.4.2 Transiente Transfektion

Für die erforderliche heterologe Expression der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in Säugerzellen wurde ein transientes Transfektions-System gewählt. Im Gegensatz zu stabilen Zelllinien, in denen ein heterologes Gen in das Wirtsgenom integriert wird um eine stabile Proteinexpression zu erzielen, erfolgt hier eine zeitlich begrenzte Synthetisierung des Rezeptors, allerdings in einem deutlich stärkerem Umfang.

Die Transfektion von COS-7-Zellen wurde mit Hilfe des polykationischen, lipophilen Transfektionsreagenz Metafectene (Biontex, Martinsried) durchgeführt. Die negativ geladene DNA wird dabei an die Metafectene-Moleküle gebunden und vollständig bedeckt, so dass eine Passage über die Cytoplasmamembran möglich ist. Für die Transfektion von HEK293-Zellen wurde FuGene6-Transfektions-Reagenz (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) verwendet.

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in Kulturschalen bzw. -platten ausgesetzt. Dabei wurde beachtet, dass die Konfluenz der Zellen am Tag der Transfektion bei 50-70 % lag. Die Transfektionsprotokolle der zwei verwendeten Zelllinien für die einzelnen Untersuchungen sind in der Tabelle 6 zusammengetragen. Bei Kotransfektionen mit zwei unterschiedlichen Konstrukten wurde (soweit nicht anders angegeben) anteilig die gleiche Menge Plasmid-DNA mit einer Endkonzentration von insgesamt 2 µg/Transfektionsansatz eingesetzt. Für die FRET-Messungen (siehe 3.3.2) wurden die eingesetzten Plasmidmengen so gewählt, dass das molare Verhältnis des YFP- und CFP-markierten Rezeptors zwischen 0,8 und 4 (YFP:CFP) lag.

Die Transfektionen mit den beiden Transfektionsreagenzien wurden nach dem jeweiligen Herstellerprotokoll über Nacht durchgeführt. Ein Mediumwechsel am nächsten Tag wurde nur bei COS-7-Zellen durchgeführt, deren Transfektion mittels Metafectene erfolgte.

Tabelle 7: Transfektionsschema der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung der analysierten Rezeptoren

		LSM FRET-Messung	Sandwich-ELISA	Bindungsassay Oberflächen- ELISA cAMP- Akkumulations- assay
Zelllinie (ausgesäte Zellen 1 Tag vor der Transfektion)	COS-7-Zellen	2x10 ⁵ Zellen/Kavität	7,5x10 ⁴ Zellen/Schale	2,5x10 ⁴ Zellen/Kavität
	HEK293-Zellen	4x10 ⁵ Zellen/Kavität		
Kulturgefäß		3-cm-Schale mit Glasplättchen, 6-Kavitäten-Platte mit Glasplättchen	6-cm-Schale	48-Kavitäten-Platte
Transfektion	µg DNA/Ansatz	2 µg	2-3 µg	2 µg
	µl Transfektions- reagenz/Ansatz	4 µl FuGene6	4 µl Metafectene	7,5 µl Metafectene
	Verdünnungsvolumen von DNA (µl Transfektionsmedium)		500 µl	750 µl
	Verdünnungsvolumen Transfektionsreagenz (µl Transfektionsmedium)	100 µl	500 µl	750 µl
	Transfektionsansatz/Kavität	ca. 124 µl	1 ml + 4 ml Transfektionsmedium	50 µl + 200 µl Transfektionsmedium

Als Transfektionsmedium wurde MEM Earle's-Medium (Biochrom, Berlin) für HEK293-Zellen bzw. DMEM-Medium (Biochrom, Berlin) für COS-7-Zellen jeweils ohne weitere Zusätze verwendet.

2.5 Fluoreszenz-Imaging

2.5.1 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Prinzip der Methode:

Die Analyse der subzellulären Lokalisation heterolog exprimierter Rezeptoren erfolgte über ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM 510 META, Carl Zeiss, Jena), das mit einem Argon-Laser ausgestattet war. Für die Aufnahmen wurde ein α -Plan-Fluar 100x/1,45-Objektiv benutzt.

2.5.2 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)

Wird Licht mit geeigneter Wellenlänge in ein System eingestrahlt, kann es von Molekülen absorbiert werden und dabei Elektronen in einen angeregten Schwingungszustand versetzen. Ein angeregtes Molekül kann seine Energie dann zum Beispiel in Form von Fluoreszenz oder Phosphoreszenz wieder abgeben. Hierbei kommt es zur Emission elektromagnetischer Strahlung, deren Wellenlänge im Vergleich zur anregenden Strahlung länger ist. Weiterhin kann ein angeregtes Fluorophor (Donor) seine Energie auch strahlungslos an ein zweites Fluorophor (Akzeptor) übertragen. Bei diesem Vorgang wird die Energie mittels induktiver Resonanz transferiert. Dieser Prozeß wird daher auch als Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) bezeichnet. Voraussetzung hierfür ist, dass die Energiedifferenz zwischen dem metastabilen Zustand und dem Grundzustand des Donors groß genug ist, den Akzeptor anzuregen. Die Effizienz des Energietransfers ist abhängig von dem Ausmaß der Überlappung zwischen den Donor-Emissions- und Akzeptor-Absorptionspektren, der relativen Orientierung der Donor- und Akzeptor-Übergangsdipole (räumliche Orientierung) und vor allem von der Distanz zwischen Donor und Akzeptor. Theodor Förster beschrieb 1948 theoretisch die quantenmechanischen Grundzüge des FRET und leitete daraus die Entfernungsabhängigkeit der Effizienz E des Energietransfers ab:

$$E = 1/(1+(r/R_0)^6)$$

Der Abstand R_0 , bei dem FRET-Effizienz 50 % beträgt, wird als Förster-Radius bezeichnet. Er ist abhängig von der Kombination der Fluorophore und liegt in der Regel bei Distanzen von weniger als 8 nm. Die Abstandsabhängigkeit konnte 1967 von Lubert Stryer und Richard Haugland durch Fluoreszenz-Experimente mit RNS-Fragmenten bekannter Länge bestätigt werden. Die FRET-Effizienz gibt Informationen über Proteindistanzen im sub-Nanometer-Bereich und sinkt typischerweise bei Entfernungen über 12 nm unter die Nachweisgrenze. Das Auftreten eines FRET ist somit ein sicherer Indikator für die nahe Lage zweier Moleküle (siehe Abb. 11).

In unseren Messungen wurde das cyan fluoreszierende Protein („cyan fluorescent protein“, CFP) als Donor und das gelb fluoreszierende Protein („yellow fluorescent protein“, YFP) als Akzeptor verwendet. Das CFP-Fluorochrom besitzt ein Absorptionsspektrum von ca. 380-475 nm ($\lambda_{\text{Amax}} = 437 \text{ nm}$) und ein Emissionsspektrum von ca. 470-530 nm ($\lambda_{\text{Amax}} = 476 \text{ nm}$). Das Absorptionsspektrum der YFP-Farbvariante umfasst den Bereich von ca. 470-515 nm ($\lambda_{\text{Amax}} = 512 \text{ nm}$). Die Emission liegt bei ca. 520-600 nm ($\lambda_{\text{Amax}} = 535 \text{ nm}$).

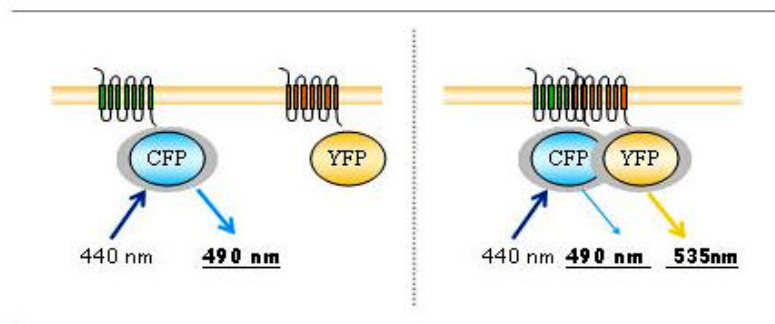


Abbildung 11: Prinzip von FRET

FRET ist die strahlungsfreie Übertragung von Photonenergie von einem angeregten Fluorophor (CFP, dem Donor) auf ein anderes Fluorophor (YFP, den Akzeptor), wenn der Abstand zwischen beiden nicht mehr als 1-10 nm beträgt (dargestellt auf der rechten Seite der Abb.). Ist das angeregte CFP weiter als 10 nm von YFP entfernt, dann findet kein Transfer statt, YFP wird nicht angeregt und emittiert somit kein Licht (linke Seite der Abb.). Mittels FRET kann die relative Nähe der Moleküle über die optische Grenze der Lichtmikroskopie hinaus aufgelöst werden. Werden die Fluoreszenzproteine molekularbiologisch an Proteine gekoppelt und in Zellen exprimiert so geben sie nicht nur Auskunft über die Protein Lokalisation, sie ermöglichen auch die Untersuchung molekularer Wechselwirkungen zwischen zwei Proteinen (Protein-Protein-Interaktion).

2.5.2.1 Akzeptor-Bleichverfahren

Bei den hier vorgestellten Experimenten wurde der FRET zwischen CFP und YFP durch Ausbleichen des Akzeptors (YFP) und gleichzeitiger Messung der Donor-Fluoreszenz (CFP) bestimmt („acceptor photobleaching“ oder „donor quenching“, siehe Abb. 12). Im Falle eines Energietransfers führt die Anregung des Donors über FRET zur Anregung des längerwelligen Akzeptors, wobei die Donor-Emission abnimmt. Durch das Ausbleichen des Akzeptors wird der Energie-Transfer unterbunden und es kommt zu einem Anstieg der Donor-Fluoreszenz entsprechend des zuvor an den Akzeptor abgegebenen Energieanteils. Diese Messungen erlauben eine direkte Quantifizierung der FRET-Effizienz (E) über die Formel:

$$E = 1 - (F_{\text{DA}} / F_{\text{D}})$$

wobei F_{DA} für die gemessene CFP-Fluoreszenz vor dem Ausbleichen des Akzeptors und F_{D} für die CFP-Fluoreszenz bei Abwesenheit des Akzeptors steht. F_{D} wurde über die Erholung der CFP-Fluoreszenzintensität während des fraktionellen Ausbleichens des Akzeptors durch lineare

Regressionsanalyse und Extrapolation der CFP-Fluoreszenz bei einer YFP-Fluoreszenz von Null bestimmt.

Durchführung:

Die HEK293-Zellen wurden auf Glasplättchen ausgesetzt, welche 24 Stunden nach der transienten Transfektion in eine Messkammer eingespannt und für die Messung mit HBS-Puffer überschichtet wurden. Die Messungen wurden an einem Zeiss Axiovert 100-Mikroskop mit einem Polychrom II-Monochromator und einer IMAGO CCD-Kamera durchgeführt. Für die Messungen wurden weiterhin ein halbdurchlässiger Spiegel (80 % Transmission, 20 % Reflexion), ein Plan-Apochromat 63x/1,4-Objektiv und ein motorisiertes Lambda 10/2-Emissionsfilterrad (Sutter Instruments, Novato, CA) mit Bandpassfiltern 460-500 nm und 535-580 nm verwendet. Bei jedem Messzyklus wurde der CFP-Donor bei 410 nm für 20-60 ms und der YFP-Akzeptor bei 510 nm für 10-15 ms angeregt. Die Aufnahme der YFP-Fluoreszenz erfolgt mit dem 535-580 nm Bandpassfilter. Das Messprotokoll begann mit 15 Zyklen in denen nur die CFP- und YFP-Emission aufgezeichnet wurde, gefolgt von 60 Zyklen bei denen zusätzlich am Ende jedes Messzyklus ein YFP-Ausbleichvorgang (2100 ms bei 512 nm) durchgeführt wurde. Die FRET-Messungen wurden ebenso wie die konfokale Laser-Scanning Mikroskopie am Institut für Pharmakologie an der Freien Universität Berlin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Schaefer durchgeführt.

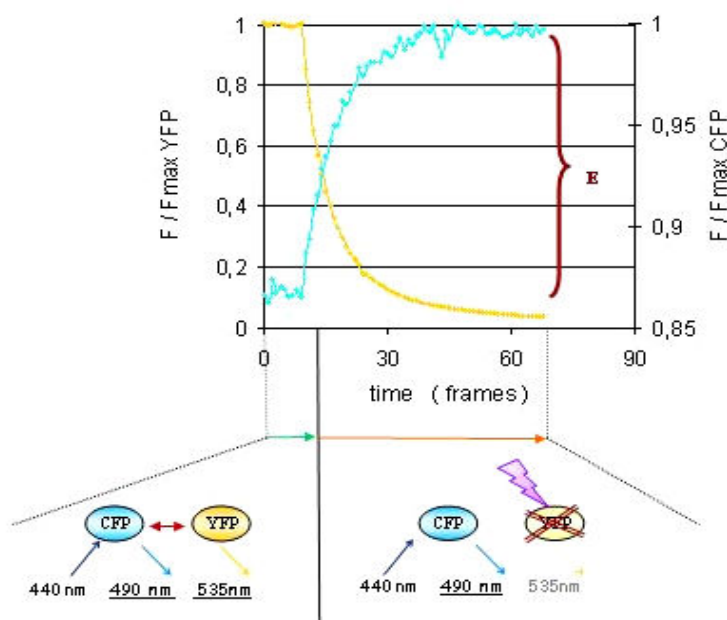


Abbildung 12: Bestimmung des FRET zwischen CFP und YFP

Je geringer der Abstand der beiden Fluorophore zueinander ist, umso mehr Energie wird durch FRET von CFP auf YFP übertragen. Durch den FRET wird die Fluoreszenz des angeregten CFP (Donor) um den der transferierten Energie entsprechenden Anteil vermindert. Die vom YFP (Akzeptor) durch das Ausbleichen zerstört (YFP *bleach*), kann kein FRET mehr stattfinden, so dass die CFP-Fluoreszenz nicht mehr durch den FRET vermindert wird. Die Zunahme der CFP-Fluoreszenz durch Ausbleichen des YFP ist proportional zur FRET-Effizienz, das heißt zum Anteil der (vor dem Ausbleichen) durch FRET übertragenen Energie des CFP.

2.6 Funktionelle Charakterisierung

2.6.1 Oberflächenbindung

Hormone binden mit einer hohen Spezifität und Affinität an ihren spezifischen Rezeptor. Um die Bindungseigenschaften verschiedener Liganden hinsichtlich eines Rezeptors vergleichen zu können, wurde mit Hilfe von Bindungsassays bestimmt, in welchem Umfang sie einen hoch affinen radioaktivmarkierten Liganden von der Bindungsstelle verdrängen können.

Für die Oberflächenbindung wurden transient transfizierte COS-7-Zellen nach 48 Stunden zunächst mit 500 µl Bindungspuffer gewaschen. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe von 100 nM bis 50 pM (100 nM, 50 nM, 0,5 nM, 50 pM; Endkonzentration auf den Zellen) des Liganden (NDP- α -MSH, α -, β - oder γ -MSH) in Bindungspuffer hergestellt. Jeweils 100 µl jeder Verdünnung und des reinen Bindungspuffers (Bestimmung des Maximalwertes) wurde auf jeweils zwei Kavitäten pro Ansatz gegeben. Zusätzlich wurden in jede Kavität 100 µl 400 pM 125 I-markierter Ligand in Bindungspuffer gegeben, sodass die Endkonzentration des radioaktiv markierten Liganden 200 pM betrug. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen zweimal mit jeweils 500 µl 4°C kaltem Bindungspuffer gewaschen und mit jeweils 500 µl 0,1 M NaOH aufgeschlossen. Die Messung der radioaktiven Strahlung des Zelllysates wurde im γ -Counter (1470 WizardTM, PerkinElmer Wallac GmbH, Freiburg) für jeweils eine Minute je Probe durchgeführt. Die erhaltenen Werte wurden für die Erstellung einer Verdrängungskurve mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism (Firma GraphPad Software, Inc; San Diego, USA) herangezogen.

Hormone

NDP- α -MSH, α -, β - oder γ -MSH

Radioaktive Substanzen

125 I-NDP- α -MSH, α -, β - und γ -MSH

(2000 Ci/mmol)

HANK's Lösung (Oberflächenbindungspuffer)

2.6.2 AlphaScreen-basierter cAMP-Akkumulationsassay

Transient transfizierte COS-7-Zellen (siehe 2.4.2, Tabelle 7) wurden zunächst mit Stimulationspuffer (100 µl/Kavität) mit 1mM IBMX, welches den Abbau des intrazellulären cAMP verhindert, für 10 Minuten bei 37°C prä-inkubiert. Für eine Konzentrations-Wirkungskurve wurde eine dekadische Verdünnungsreihe von 1000 nM bis 0,1 nM Ligand im selben

Puffergemisch angesetzt. Pro Kavität wurden dann 100 µl Stimulationsansatz aufgetragen, wobei für jede Konzentrationsbedingung ein Dreifachansatz durchgeführt wurde. Zur Bestimmung des Basalwertes wurde 1 mM IBMX gelöst in Stimulationspuffer ohne Ligand eingesetzt. Die Stimulation erfolgte für 30 Minuten bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl/Kavität kaltem Lysispuffer aufgenommen und eine Stunde bei 4°C geschüttelt. Das so gewonnene Zelllysate wurde für das cAMP-Assay verwendet.

Zur Darstellung der relativen Veränderung der intrazellulären cAMP-Konzentration, wie sie durch Ligandenaktivierung eines G_s- oder G_i-Protein-gekoppelten Rezeptors gegenüber dem Basalwert zustande kommt, wurde der AlphaScreen cAMP-Assay Kit von PerkinElmer (Boston, Ma, USA) verwendet. Biotinyliertes cAMP wird von Streptavidin-konjugierten-Donorbeads und anti-cAMP-Antikörper-konjugierten Akzeptorbeads gebunden. Dadurch nähern sich die Beads soweit an, dass ein von außen zugeführter Laserimpuls vom angeregten Donor zum Akzeptor weitergeleitet wird und ein Signal detektiert werden kann. Steigende Konzentrationen von cAMP in der Probe verdrängt das biotinylierte cAMP vom Akzeptorbead und führen zu einer proportionalen Abnahme des Signals (siehe Abb. 13).

Eine Standardreihe (von 5 µM bis 50 pM) wurde in Lysispuffer mit einer 50 µM cAMP-Standardlösung von PerkinElmer nach Protokollangaben der Herstellerfirma angefertigt. In einem Vorversuch wurde eine geeignete Verdünnung des Zelllysates ermittelt, um in den linearen Messbereich des cAMP-Assays zu gelangen. In einer OptiPlate-384-Mikrotiterplatte (PerkinElmer, Boston, USA) wurden pro Kavität 5 µl Lysat (bzw. die entsprechende Menge der Standardreihe) vorgelegt und jeweils 1 Unite Akzeptorbeads (0,1 µl der Stammlösung mit 10 Unites/µl) in 10 µl SO-Puffer hinzu pipettiert. Da die Donorbeads einen Photosensitizer enthalten und somit lichtempfindlich sind, wurde das Bestücken der OptiPlate-384-Mikrotiterplatte bei Grünlicht durchgeführt und die Platten anschließend mit selbstklebender Aluminiumfolie (AlumaSealIITM von ROTH, Karlsruhe, Deutschland) lichtgeschützt verschlossen. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden 1 Unite Donorbead (0,1 µl der Stammlösung mit 10 Unites/µl) und 1 Unite biotinyliertes cAMP (0,0075 µl der Stammlösung mit 133 Unites/µl) in 10 µl SO-Puffer/Kavität dazu gegeben. Die Vermessung der Platte erfolgte nach einer Stunde mit einem Mithras LB 940 Multimode Plate Reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad) entsprechend den Angaben des Herstellers (Extinktion bei 680 nm und Emission bei 520nm bis 620 nm). Die Auswertung wurde mit Hilfe des Computerprogramms Graph Pad Prism (San Diego, Ca, USA) durchgeführt.

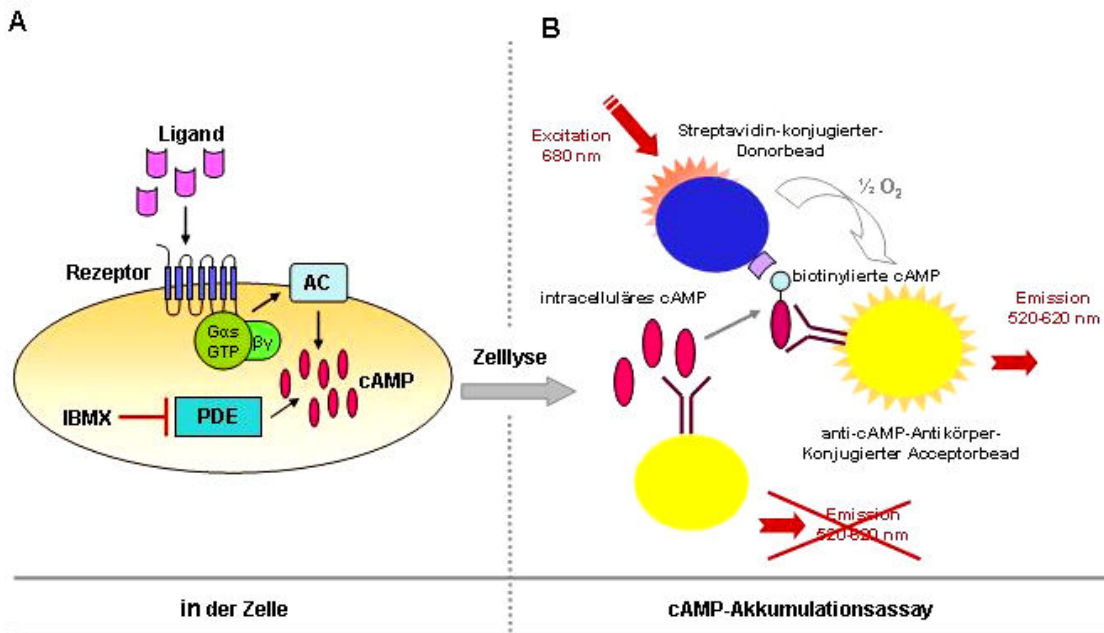


Abbildung 13: Prinzip des AlphaScreen cAMP-Assay Kits

A: Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors durch die Bindung eines spezifischen Liganden. Die daraus resultierende Konformationsänderung des Membranproteins bewirkt die Aktivierung der heterotrimeren stimulatorischen oder inhibitorischen G-Proteine (Gs oder Gi). Das an die α -Untereinheit gebundene GDP (Guanosin-5'-diphosphat) wird gegen GTP (Guanosin-5'-triphosphat) ausgetauscht und der Komplex $\alpha\beta\gamma$ -GTP dissoziiert. Der lösliche α -GTP-Komplex leitet das Signal weiter an Adenylat Cyclasen (AC). Diese Enzyme produzieren den second messenger zykisches Adenosin-3'-5'-monophosphat (cAMP). Die Aktivität der cAMP-Phosphodiesterase (PDE) wird durch IBMX gehemmt.

B: Ein Photosensitizer in den Donorbeads überträgt die Energie eines Laserimpulses (680 nm) auf umgebende Sauerstoffmoleküle. Biotinyliertes cAMP wird von Streptavidin-konjugierten Donorbeads und anti-cAMP-Antikörper-konjugierten Akzeptorbeads gebunden. Dadurch gelangen die Beads in räumliche Nähe, der angeregte Sauerstoff reagiert mit dem Akzeptorbead und das entstehende Fluoreszenzsignal (520 – 620 nm) wird detektiert. Das durch Zelllyse gewonnene intrazelluläre cAMP verdrängt in einem solchen Ansatz das biotinylierte cAMP von der Bindungsstelle (cAMP-Antikörper) am Akzeptorbead und bewirkt so eine Reduktion des Signals.

Stimulationspuffer, Lysispuffer, SO- Puffer

Liganden (Hormone)

α , β oder γ -MSH, Ghrelin

Inhibitoren

PTX, U-73122, W7

2.6.3 Bestimmung des intrazellulären Inositolphosphat-Akkumulation (IP-One ELISA)

Zur Darstellung der Aktivierung der Phospholipase C (PLC) in Abhängigkeit von der Liganden-vermittelten Stimulation eines G_q -Protein-gekoppelten Rezeptors wurde der IP-One ELISA Kit von HTRF®/Bioassays (bezogen über bioassays@cisbiointernational.fr) verwendet. Die Durchführung des Assays erfolgte entsprechend den Herstellerangaben und unter Verwendung der im Kit enthaltenen Puffer und Antikörper.

Dieser kompetitive Immunoassay basiert auf dem Nachweis von D-*myo*-Inositol 1 Phosphat (IP1), einem Abbauprodukt des sekundären Botenstoffs Inositoltriphosphat, welcher in Folge der Aktivierung der PLC freigesetzt wird und die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im Cytoplasma bewirkt. Steigende Konzentrationen von intrazellulärem IP1 in der Probe führen zur Verdrängung des HRP-markiertem IP1 vom Anti-IP1-Antikörper und spiegeln sich in einer proportionalen Abnahme des detektierten Signals wieder (siehe Abb. 14). Die Detektion erfolgt durch eine Peroxidase-katalysierte Farbreaktion. Mit Hilfe einer Standardkurve mit bekannten Mengen des IP1 lässt sich die Konkurrenz um die Bindungsstelle des Anti-IP1-Antikörpers quantifizieren.

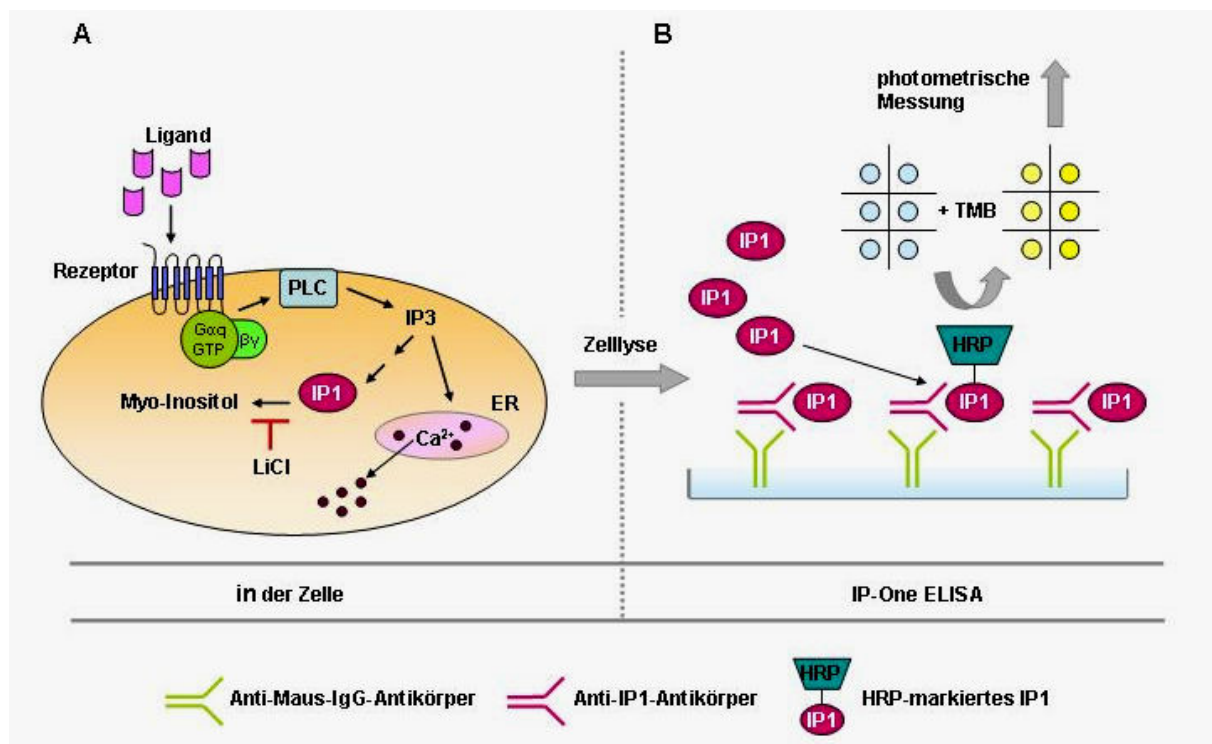


Abbildung 14: Prinzip des IP-One ELISA zur Bestimmung der intrazellulären Inositolphosphat-Akkumulation

A: Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors durch die Bindung eines spezifischen Liganden. Die daraus resultierende Konformationsänderung des Membranproteins bewirkt die Aktivierung des G_q -Proteins. Der lösliche α -GTP-Komplex leitet das Signal weiter an die Phospholipase C (PLC). Diese Enzym produziert den second messenger Inositoltriphosphat (IP3), welcher die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) steuert. Lithiumchlorid (LiCl) hemmt den Abbau der Inositolphosphate.

B: Steigende Konzentrationen von intrazellulärem IP1 in der Probe führen zur Verdrängung des HRP-markiertem IP1 vom Anti-IP1-Antikörper und spiegeln sich in einer proportionalen Abnahme des detektierten Signals wieder.

Transient kotransfizierte COS-7-Zellen (siehe 2.4.2, Tabelle 7) wurden mit 1 μM /Kavität α -, γ -MSH oder Ghrelin für eine Stunde im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 stimuliert. Zur Bestimmung des Basalwertes wurde der Stimulationpuffer, welcher 50 mM Lithiumchloride (LiCl) enthielt, um den Abbau der Inositolphosphate (IP) zu verhindern, ohne Ligand eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen in 30 μl (bei einer 96-Kavitäten-Platte) oder 50 μl /Kavität (bei einer 24-Kavitäten-Platte) Lysispuffer aufgenommen und erneut für 30 Minuten bei 37 °C im

Brutschrank inkubiert. Das so gewonnene Zelllysate wurde in eine vom Hersteller mit dem Anti-Maus-IgG-Antikörper beschichtete ELISA-Platte überführt und zusammen mit einem Anti-IP1-Antikörper und HRP (Horse-Radish Peroxidase)-markiertem Ip1 für 3 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden nicht gebundene Proteine durch sechsmaliges Waschen entfernt und die enzymatische Farbreaktion durch Zugabe des Substrates TMB (3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine) gestartet. Nach 20 bis 30 Minuten wurde die Reaktion abgestoppt und die Extinktionsmessung bei 450 nm durchgeführt.

2.7 Biochemische Methoden

2.7.1 Bestimmung der Oberflächenexpression durch ELISA

Die Untersuchung der Oberflächenexpression der einzelnen Rezeptoren wurde auf immunologischer Basis (ELISA; Enzyme Linked Immunosorbent Assay) durchgeführt. Hierfür wurde der N-Terminus der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, welcher extrazellulär lokalisiert ist, mit einem HA-Epitop markiert und ermöglichte so die spezifische Detektion der in der Zellmembran exponierter Proteine (siehe Abb. 15).

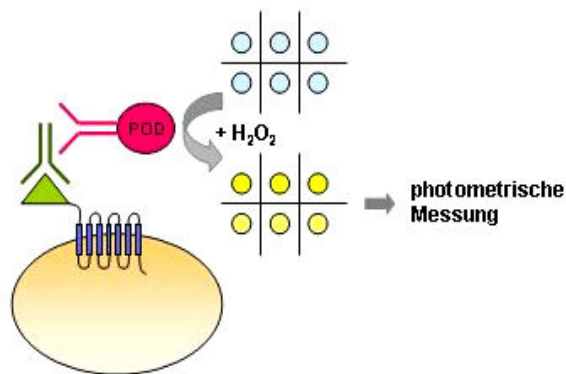


Abbildung 15: Prinzip des Oberflächen-ELISAs

Der mit einem HA-Epitop markierte N-Terminus des Rezeptors ist nach dem Einbau in die Cytoplasmamembran extrazellulär lokalisiert, was eine spezifische Detektion an der Zelloberfläche ermöglicht. Als Primäntikörper wird ein Biotin-markierter Anti-HA-Antikörper verwendet (*grün*). Zur Detektion wird Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin herangezogen (Sekundärerantikörper, *pink*). Die Peroxidase (POD) oxidiert o-Phenyldiamin (Substratlösung), wobei ein gelber Farbstoff entsteht, so dass hierüber eine photometrische Qualifizierung der Antikörperhybridisierung möglich ist.

Zwei Tage nach der transienten Transfektion (siehe 2.4.2, Tabelle 7) wurden die Zellen zunächst zweimal mit je 200 μ l/Kavität PBS gewaschen und mit je 100 μ l/Kavität 4% Formaldehyd in PBS für 30 Minuten bei 37°C fixiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit 200 μ l/Kavität PBS

wurden unspezifische Bindungsstellen mit 200 µl/Kavität COS-7-Vollmedium für eine Stunde bei 37°C blockiert. Für die erste Hybridisierung wurde ein Biotin-gekoppelter Anti-HA-Antikörper in COS-7-Vollmedium mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml verwendet (100 µl/Kavität). Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei 37°C wurden die Zellen mit 200 µl PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen, bevor eine zweite Hybridisierung mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin in COS-7-Vollmedium mit einer Konzentration von 0,2 µg/mL (100 µl/Kavität) für eine Stunde bei 37°C angesetzt wurde. Danach wurden die Zellen erneut dreimal mit 200 µl/Kavität PBS gewaschen, bevor die Enzymreaktion durch die Zugabe von 150 µl/Kavität Substratlösung gestartet wurde. Die Oxidation von o-Phenyldiamin resultiert in einem Farbumschlag der Proben von farblos zu gelb. Nach ca. zwei Minuten bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 50 µl/Kavität einer Lösung von 1 M HCl und 0,05 M Na₂SO₃ gestoppt. Die Extinktion wurde bichromatisch bei 492 nm und 620 nm (Referenz) in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Athos Reader 2001; Athos, Krefeld) gemessen.

Antikörper

Anti-Hämagglutinin (HA)-Biotin-Konjugat,
Streptavidin-Peroxidase (POD)-Konjugat

Substratlösung, Substratpuffer**2.7.2 Bestimmung der Dimerisierungseigenschaften durch ELISA (Sandwich ELISA)**

Zur Darstellung der Dimerisierungseigenschaften zweier G-Protein-gekoppelter Rezeptoren wurden zwei unterschiedliche Antikörper eingesetzt, die spezifisch an unterschiedliche Antigene binden. Der erste Antikörper (Coating-Antikörper) bindet an eine feste Phase und ist gegen das Flag-Epitop gerichtet (anti-Flag-M2-Antikörper). Ein zweiter Antikörper ist gegen das HA-Epitop gerichtet und Biotin-gekoppelt. An dieses Biotin bindet ein Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin-Konjugat und realisiert eine enzymatische Farbreaktion, worüber eine photometrische Quantifizierung der Antikörperhybridisierung möglich ist (siehe Abb. 16).

Für die transiente Transfektion von COS-7-Zellen wurden jeweils zwei unterschiedlich markierte Rezeptoren (N-terminal ein HA-Epitop oder C-terminal ein Flag-Epitop) zu gleichen Anteilen eingesetzt (siehe 2.4.2, Tabelle 6). Nach 72 Stunden wurden die Zellen zweimal mit 5 ml kaltem PBS gewaschen und mit einem Zellschaber auf Eis in einigen Tropfen PBS geerntet. Im Anschluß an einen drei-minütigen Zentrifugationsschritt bei 10.000 rpm und 4°C, wurde das resultierende Zellpellet sorgfältig in 2 ml kaltem Aqua dest. resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 13.000 rpm wurden nun die Zellmembranen pelletiert. Das entstandene Pellet wurde in 150 µl

Lysispuffer resuspendiert und zur Freisetzung der Membranproteine über Nacht bei 4°C in einem Rotationsschüttler inkubiert. Die Proteinsuspension wurde anschließend für 15 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert um lösliche und unlösliche Zellbestandteile zu trennen. Der Überstand wurde mit 200 µl PBS-T versetzt.

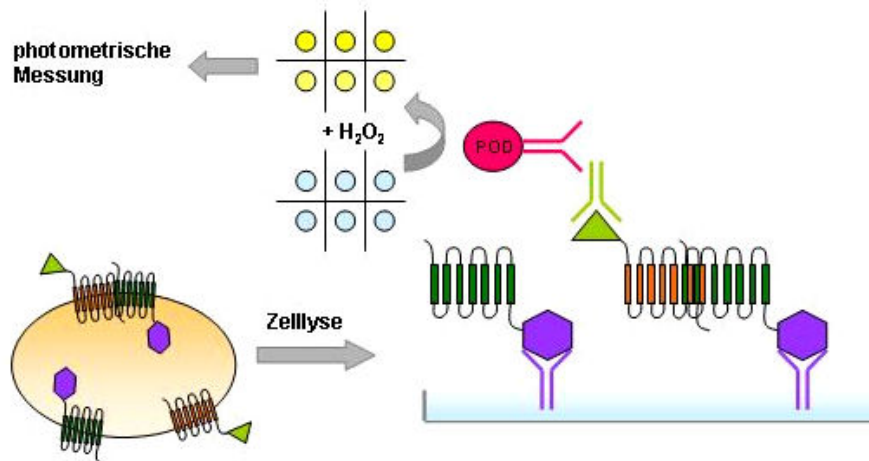


Abbildung16: Prinzip des Sandwich-ELISAs.

Ein am C-Terminus Flag-Epitop-markierter Rezeptor wird an den Coating-Antikörper (anti-Flag-M2-Antikörper, *lila*) gebunden. Im Fall einer Dimerisierung der beiden heterolog exprimierten Rezeptoren bindet ein zweiter Antikörper (Biotin-markierter anti-HA-Antikörper, *grün*) an das HA-Epitop des entsprechend markierten koexprimierten Rezeptors. Die Detektion erfolgt über ein Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin-Konjugat (*pink*). Die Oxidation von o-Phenyldiamin führt zu einem sichtbaren Farbumschlag, welcher eine photometrische Quantifizierung der gebildeten Dimere ermöglicht.

Die Beschichtung der 96-Kavitäten-Platte mit dem anti-Flag-M2-Antikörper in einer Konzentration von 10 µg/ml Beschichtungspuffer (100 µl/Kavität) erfolgte ebenfalls über Nacht. Am darauf folgenden Tag wurde die Antikörperlösung entfernt, die Kavitäten zunächst einmal mit jeweils 200 µl COS-7-Vollmedium gewaschen und dann mit dem selben Volumen Vollmedium für eine Stunde bei 37°C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen vor den Hybridisierungen zu blockieren. Dann wurden die Kavitäten dreimal mit jeweils 200 µl PBS-T gewaschen und mit der Proteinsuspension (100 µl/Kavität Suspension in Dreifachbestimmung) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundene Proteine wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS-T entfernt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit einem Biotin-markierten anti-HA-Antikörper in einer Konzentration von 1 µg/ml PBS-T (100 µl/Kavität) für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach viermaligem Waschen mit jeweils 200 µl PBS-T/Kavität wurde mit dem POD-markierten Streptavidin-Konjugat in einer Konzentration von 0,2 µg/ml PBS-T (100 µl/Kavität) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte viermal mit 200 µl PBS-T/Kavität gewaschen und die enzymatische Farbreaktion durchgeführt. Dazu wurden 150 µl Substratlösung/Kavität zugegeben. Nach drei Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von

50 µl Stopplösung/Kavität (1 M HCl mit 0,05 M Na₂SO₃) abgestoppt. Die Extinktionsmessung wurde wie unter 3.5.1 beschrieben durchgeführt.

Antikörper

Anti-Hämagglutinin (HA)-Biotin-Konjugat, Anti-Flag-M2-Antikörper, Streptavidin-Peroxidase (POD)-Konjugat

Lysispuffer, Beschichtungspuffer, PBS-T, Substratlösung, Stopplösung

3 Ergebnisse

3.1 Homo- und Heterodimerisierung von hypothalamischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren können Homo- und Heterodimere sowie Oligomere bilden (Bouvier, 2001; George et al., 2002). Um die Assemblierung von unterschiedlichen in die hypothalamische Appetitregulation involvierten Rezeptoren verfolgen zu können, wurden Fusionsproteine mit den cyanen und gelben Farbvarianten des GFP (green fluorescence protein) sowie dem HA- und Flag-Epitop generiert. Die Interaktionsfähigkeit zwischen den Rezeptoren wurde über die Darstellung der subzellulären Lokalisation kotransfizierter fluoreszierender Rezeptor-Fusionsproteine (Kokalisation), FRET und Sandwich ELISA bestimmt. Weiterhin wurde mittels trunkierter MC4R-Konstrukte, dem Einsatz von DTT zur Detektion von möglichen Cystein-Brücken innerhalb von Homo- und Heterodimeren sowie MC3R- und GHSR-Mutanten untersucht, welche strukturellen Determinanten zur Dimerbildung beitragen. Als mögliche Funktionen der Dimerisierung werden die:

- (1) Faltung und Transport vom endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran
- (2) Ligandenbindung
- (3) G-Protein-Spezifität
- (4) Signaltransduktion

diskutiert (nach Terrillon und Bouvier, 2004; Jacoby et al., 2006; siehe auch Einleitung 1.2.3, Abb. 6).

3.1.1 Subzelluläre Lokalisation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Appetitregulation

Zunächst wurde mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie die Expression und subzelluläre Lokalisation der einzelnen fluoreszierenden Rezeptor-Fusionsproteine in HEK293-Zellen bestimmt (siehe Abb. 17). Hier war zu erkennen, dass bei MC3R, GHSR, μ -OPR, MC4R, 5HTR_{1B} und CB1R noch ein erheblicher Anteil des Proteins im endoplasmatischen Retikulum vorlag, jedoch auch eine Färbung der Plasmamembran zu erkennen. Im Gegensatz dazu zeigt NPY2R eine vorwiegende in der Plasmamembran vorliegende homogene Verteilung. GPR7 lag hauptsächlich in intrazellulären vesikulären Strukturen vor.

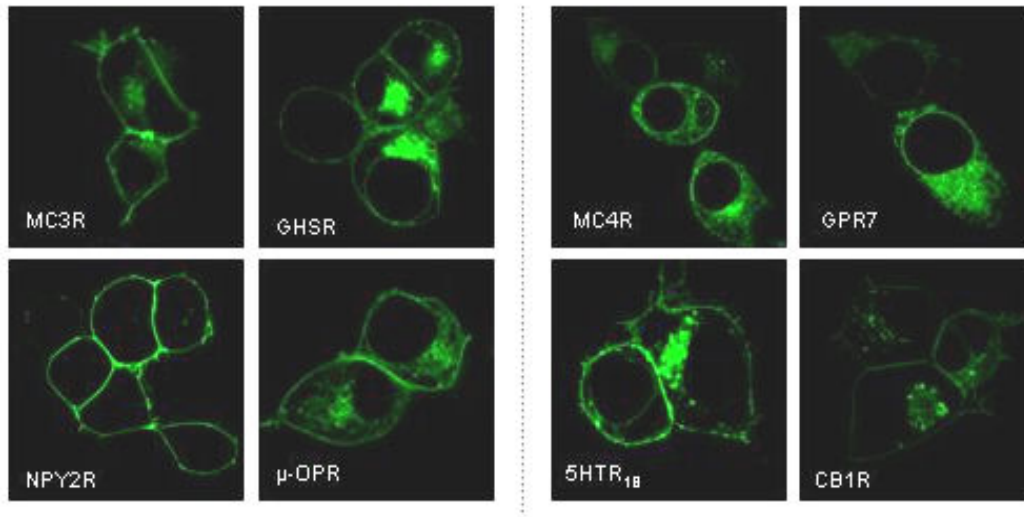


Abbildung 17: Expression und Lokalisation von unterschiedlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Appetitregulation in HEK293-Zellen

Die Rezeptoren wurden C-terminal mit YFP fusioniert und transient in HEK293-Zellen zur Expression gebracht. Die Lokalisation der fluoreszierenden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wurde 20-26 h nach der Transfektion mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop bestimmt. Dargestellt sind jeweils repräsentative Expressionsmuster der unterschiedlichen YFP-markierten Rezeptoren aus 1-2 unabhängigen Transfektionen.

3.1.1.1 Untersuchung der Oberflächenexpression von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Appetitregulation

Mit Hilfe des Oberflächen-ELISAs wurde spezifisch die Oberflächenexpression von heterolog exprimierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in COS-7-Zellen bestimmt. Für die transiente Transfektion der Säugerzelllinie wurden N-terminal HA-Epitopmarkierte Konstrukte verwendet (Material & Methoden, 2.4.2). In der Abbildung 18 sind die Ergebnisse der Einzelexpression im prozentualen Verhältnis der optischen Dichte zu der des rM3R (Ratten-muscarine Rezeptor 3) dargestellt, der hier als Positivkontrolle für eine optimale Oberflächenexpression herangezogen wurde. Alle untersuchten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind in unterschiedlichem Umfang an der Zelloberfläche exprimiert. Im Vergleich zur Positivkontrolle rM3R konnte für NPY2R, GHSR und 5HTR_{1B} eine 3 bis 4 fache Reduktion der Zelloberflächenexpression bestimmt werden. MC3R, μ -OPR, MC4R und CB1R sind überwiegend in der Plasmamembran lokalisiert. Die deutlich reduzierte Oberflächenexpression des GPR7 bestätigt die, anhand der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie beobachtete intrazelluläre Verteilung dieses G-Protein-gekoppelten Rezeptors.

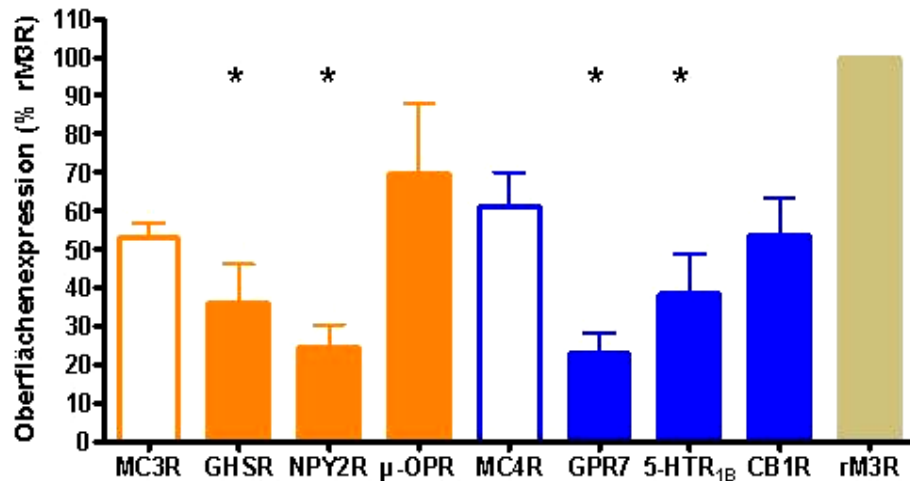


Abbildung 18: Oberflächenexpression von unterschiedlichen in die Appetitregulation involvierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in COS-7-Zellen.

COS-7-Zellen wurden mit N-terminal HA-markierten Konstrukten transient transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit Hilfe von Formaldehyd fixiert und der extrazelluläre Hämagglutinin-Tag immunochemisch quantifiziert. Die Ergebnisse von vier bis sechs unabhängigen Experimenten (pro Ansatz Hexplikaten) sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen (SD) angegeben und wurden in Zusammenarbeit mit Patrick Tarnow (Doktorand unserer Arbeitsgruppe) erstellt. Zur Darstellung der signifikanten Unterschiede zum rM3R (Positivkontrolle) wurde One-Way ANOVA mit anschließendem Dunnett-Test durchgeführt ($p < 0,01$ *).

3.1.2 Subzelluläre Lokalisation von koexprimierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der hypothalamischen Appetitregulation

Die Ausbildung von Heterodimeren setzt eine Kolo­kalisation der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in der Plasmamembran voraus. Die Proteinfaltung sowie der Transport vom endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran kann möglicherweise auch durch einen anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptor beeinflusst werden. Daher wurden die verschiedenen in die Appetitregulation involvierten Rezeptoren als CFP- bzw. YFP-Fusionsproteine in HEK293-Zellen koexprimiert und die Proteinverteilungsmuster der verschiedenen Rezeptor-Paare bestimmt.

Die GPCRs wurden aufgrund ihrer Kolo­kalisation entweder mit dem MC3R im Nucleus arcuatus (ARC, Farbcode: orange, Abb. 19A) oder dem MC4R im Nucleus paraventricularis (PVN, Farbcode: blau, Abb. 19B) des Hypothalamus mit MC3R oder MC4R koexprimiert (siehe Einleitung 1.2.1, Tabelle 2).

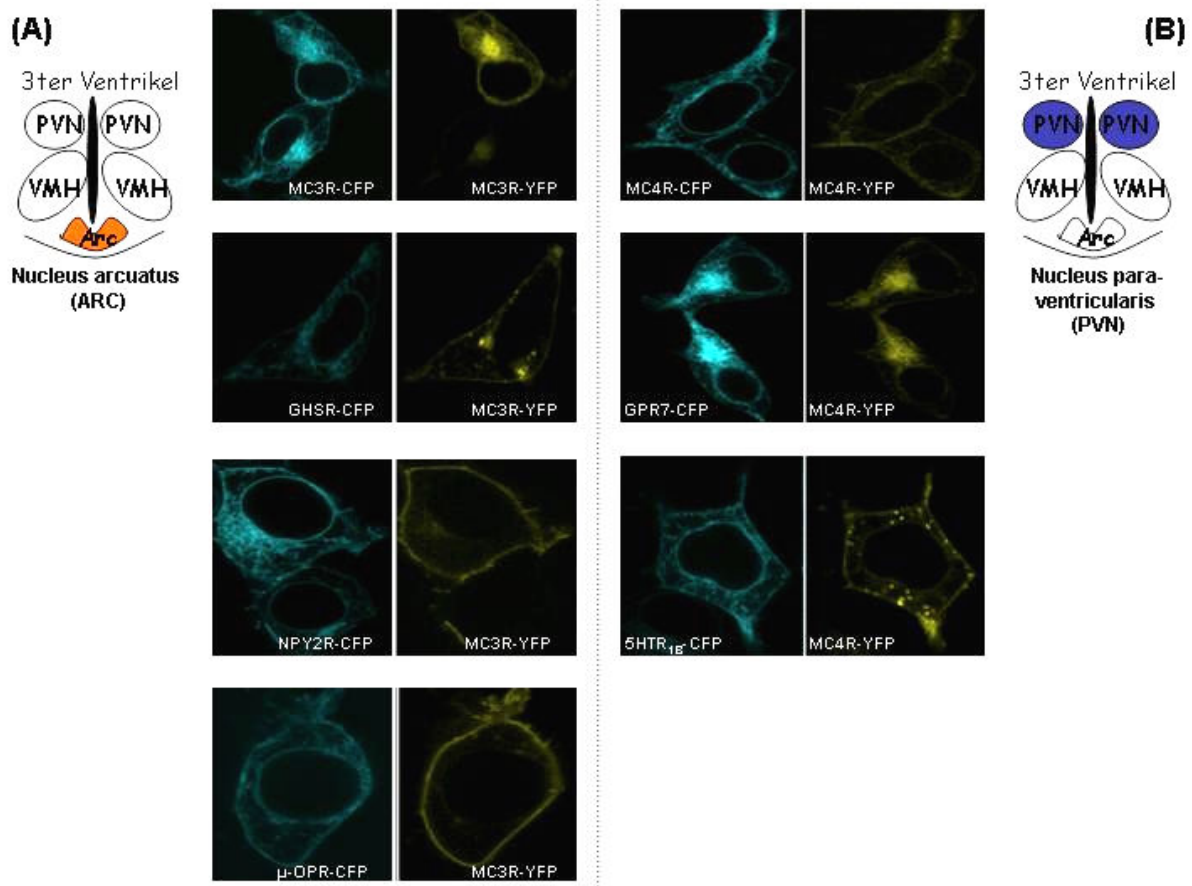


Abbildung 19: Subzelluläre Lokalisation koexprimierter G-Protein-gekoppelter Rezeptoren der Appetitregulation

Unterschiedliche G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wurden in Abhängigkeit von ihrer *in vivo* Kolo-kalisation mit MC3R oder MC4R im Hypothalamus in HEK293-Zellen kotransfiziert. **(A)** Nucleus arcuatus (Arc, orange). **(B)** Nucleus paraventricularis (PVN, blau). Jeweils ein CFP- und ein YFP-markierter Rezeptor wurden transient in HEK293-Zellen koexprimiert und deren Verteilung in derselben Zelle mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie aufgezeichnet. Die Bilder sind repräsentativ für je zwei unabhängige Transfektionen.

Ein weitgehend übereinstimmendes Verteilungsmuster der jeweils kotransfizierten Rezeptoren in der Plasmamembran und im endoplasmatischen Retikulum zeigte sich bei den Koexpressionen MC3R+MC3R und MC4R+MC4R (Homodimere), GHSR+MC3R, μ -OPR+MC3R und 5HTR_{1B}+MC4R (Abb. 19). Wobei für die letzte Kombinatorik eine Cluster-artige Anordnung der Rezeptoren innerhalb der Zelle zu erkennen war. Eine Kolo-kalisation war auch bei der Kombinatorik NPY2R+MC3R zuerkennen, wobei zu beachten ist, dass NPY2R bei alleiniger Expression vorwiegend in der Plasmamembran vorlag (Abb. 17). Die Kotransfektion von GPR7 mit MC4R resultierte in einer Veränderung des intrazellulären Verteilungsmusters des einzeln exprimierten GPR7 (Abb. 17). Für beide Rezeptoren war eine übereinstimmende Lokalisation sowohl in der Plasmamembran als auch im endoplasmatischen Retikulum zu sehen.

3.1.3 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der hypothalamischen Appetitregulation

Zum Nachweis einer direkten Interaktion zwischen unterschiedlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wurden FRET-Analysen durchgeführt. Die CFP-fusionierten Rezeptoren wurden entweder mit dem YFP-markierten MC3-oder MC4-Rezeptor in HEK293-Zellen transient koexprimiert. Um die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung reiner CFP-markierter Rezeptorkomplexe gering zu halten, wurde darauf geachtet, dass das molare Verhältnis (YFP:CFP) im Bereich von 2:1 bis 4:1 lag. Nach 24 Stunden wurde die FRET-Effizienz durch die Bestimmung der Intensitätszunahme des Donorfluorochroms während des Ausbleichens des Akzeptors (YFP-Fluorophor) ermittelt. Als Zeichen einer intakten Dimerisierung wurde eine FRET-Effizienzen zwischen 8-25 % festgesetzt (Abb. 20).

Die Homodimerisierung von MC3R als auch von MC4R, die bereits von Mandrika und Mitarbeitern (2004) für MC3R und von Biebermann und Mitarbeitern (2003) sowie Nickolls und Mitarbeitern (2006) für MC4R beschrieben wurde, konnte bestätigt werden. In beiden Fällen wurde ein signifikanter FRET mit einer Effizienz von $15,2 \% \pm 1,3 \%$ bzw. $17,3 \% \pm 2,4 \%$ ermittelt. Diese Werte wurden zum Vergleich der verschiedenen Koexpressionspaare herangezogen. Bei Koexpressionen des YFP-markierten MC3-oder MC4-Rezeptors mit CB1R-CFP wurden die niedrigsten FRET-Signale ($5,1 \% \pm 2,3 \%$ bzw. $5,9 \% \pm 1,2 \%$) erreicht. Da diese Werte unter der gesetzten Grenze für eine intakte Dimersierung liegt, kann hier auf das Ausbleiben einer Interaktion zwischen den Rezeptoren geschlossen werden. Somit wurde diese Koexpression als Negativkontrolle angesehen.

Die hohe FRET-Effizienz von $16,1 \% \pm 0,9 \%$ zwischen MC3R-YFP und GHSR-CFP legt hingegen die Vermutung einer Heterodimerisierung der beiden in die Appetitregulation involvierten Rezeptoren nahe. Dieser Wert ist vergleichbar mit dem FRET-Signal des MC3R-Homodimers. Die für die Expressionskombinationen NPY2R-CFP und MC3R-YFP sowie für μ -OPR-CFP und MC3R-YFP nachgewiesenen FRET-Effizienzen fielen deutlich schwächer aus ($8,3 \% \pm 1,4 \%$ und $9,7 \% \pm 3,0 \%$).

MC4R-YFP erreichte nur nach der Kotransfektion mit GPR7-CFP eine signifikante FRET-Effizienz von $19,6 \% \pm 2,6 \%$, die sogar leicht über dem FRET-Signal des MC4R-Homodimers lag. Diese Befunde weisen auf eine Interaktion zwischen diesen beiden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der hypothalamischen Appetitregulation hin. Im Gegensatz dazu lässt die niedrige FRET-Effizienz von $9,3 \% \pm 0,3 \%$ eine eher schwache Interaktionsfähigkeit zwischen MC4R-YFP und 5-HTR_{1B}-CFP vermuten.

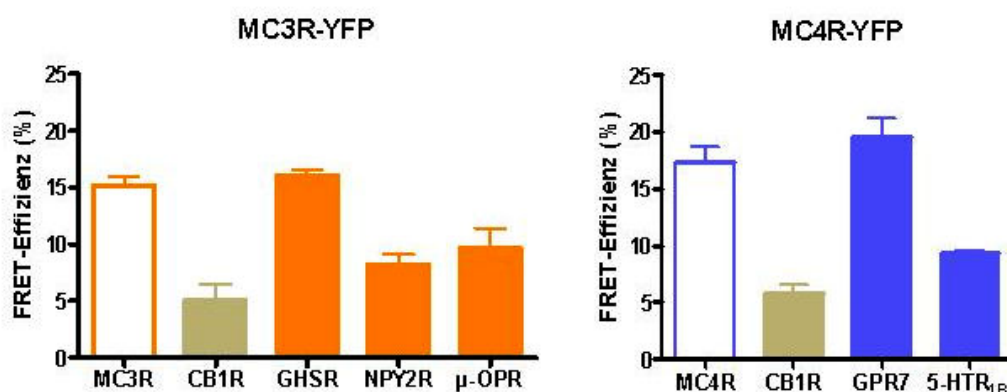


Abbildung 20: FRET-Bestimmung zwischen MC3R oder MC4R und verschiedenen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Appetitregulation

HEK293-Zellen wurden transient mit Expressionsplasmiden kotransfiziert, die für den YFP-fusionierten MC3R oder MC4R und unterschiedliche CFP-markierte Rezeptoren kodieren. Die FRET-Effizienz wurde über das Akzeptor-Bleichverfahren bestimmt (siehe Material & Methoden 2.5.2.1). Mit ungefüllten Balken sind die FRET-Effizienzen bei Koexpression gleicher G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (MC3R/MC3R bzw. MC4R/MC4R) gekennzeichnet. Die gefüllten Balken zeigen die FRET-Effizienz für die Koexpression von unterschiedlichen in die Appetitregulation involvierten Rezeptoren mit entweder MC3R oder MC4R. Die Negativkontrolle (CB1R) ist in beiden Diagrammen beige koloriert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (SD) von jeweils 3 unabhängigen Experimenten.

3.1.4 Sandwich ELISA

Um aufzuklären, ob bei den Kombinatoriken mit niedrigen FRET-Effizienzen tatsächlich keine direkten Interaktionen zwischen den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren vorlag, oder ob nur die sterischen bzw. räumlichen Bedingungen zwischen den Fluorochromen für die Ausbildung von FRET nicht optimal waren, wurde eine zweite biochemische Methode genutzt, um die Dimerisierungseigenschaften der Rezeptorpaare nochmals zu überprüfen. Für den Sandwich ELISA wurden COS-7-Zellen transient mit ausgesuchten N-terminal HA-Epitop-markierten Appetitrezeptoren und dem C-terminal Flag-Epitop-markierten MC3R oder MC4R kotransfiziert. Nach Membranpräparation und Solubilisierung wurden zunächst die Rezeptor-Komplexe mit einem Anti-Flag-Antikörper immobilisiert. Die Heterodimere wurden dann über das HA-Epitop nachgewiesen (siehe Material & Methoden 2.7.2).

Die Kotransfektion von CB1R-HA mit MC3R-Flag bzw. MC4R-Flag führte verglichen mit den Homodimeren (MC3R-HA und MC3R-Flag sowie MC4R-HA und MC4R-Flag) nicht zu einem Anstieg der optischen Dichte (Abb. 21). Diese Daten zeigen in guter Übereinstimmung mit den zuvor dargelegten FRET-Analysen, dass CB1R weder mit MC3R noch mit MC4R Heterodimere ausbildet.

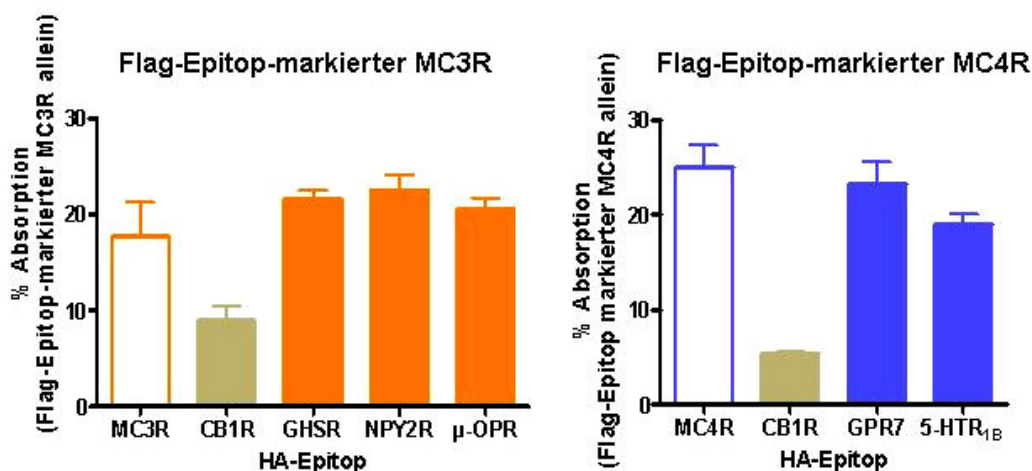


Abbildung 21: Rezeptordimerisierung der unterschiedlichen HA-Epitop-markierten G-Protein-gekoppelten Appetit Rezeptoren und dem Flag-Epitop-markierten MC3R oder MC4R

Die Bestimmung erfolgte mittels ELISA (siehe Material & Methoden 2.7.2), die dargestellten Werte wurden aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Transient transfizierte COS-7-Zellen wurden über Nacht aufgeschlossen und in Flag-Antikörper-beschichteten Mikrotiterplatten inkubiert. Im Fall einer Rezeptordimerisierung konnte das N-terminale HA-Epitop detektiert werden. Die Determination des N-terminalen HA-Epitops erfolgte durch eine Zunahme der optischen Dichte. Die Werte sind im prozentualen Verhältnis der optischen Dichte zu der des einzeln exprimierten MC3R bzw. MC4R mit C-terminaler Flag-Epitop-Markierung. Ergebnisse der Koexpressionen gleicher G-Protein-gekoppelter Rezeptoren sind durch ungefüllte Balken markiert, im Gegensatz zu den gefüllten Balken der Kombinatoriken mit unterschiedlichen GPCRs.

Die ermittelten Werte für die Koexpression von GHSR-HA, NPY2R-HA oder μ -OPR-HA mit MC3R-Flag legen in allen drei Fällen eine Interaktion der Rezeptoren nahe (Abb. 21). Dabei ist zu beachten, dass die optische Dichte deutlich über der des entsprechenden MC3R-Homodimers lag. Die aufgrund der bereits dargestellten FRET-Untersuchungen vermutete heteromere Interaktion zwischen den beiden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren GHSR und MC3R konnte bestätigt werden. Hinsichtlich der beiden anderen Kandidaten NPY2R und μ -OPR konnte zu diesem Zeitpunkt der Untersuchungen keine eindeutige Aussage hinsichtlich der Formation von Heterodimeren getroffen werden, da die Ergebnisse der beiden durchgeführten Methoden gegensätzlich sind.

Weiterhin wurde für die Kombinatorik GPR7 und MC4R eine Interaktion an Hand der signifikanten FRET-Effizienz angenommen. Diese Heterodimerisierung konnte nun durch die signifikante optische Dichte des immunologischen Assays bestätigt werden (Abb. 21). Im Fall von 5HTR_{1B}-HA lag die optische Dichte unter der des MC4R-Homodimers und unter der des Heterodimers GPR7-HA und MC4R-Flag.

Zusammenfassend konnte durch den Einsatz von zwei unterschiedlichen Methoden sowohl für den MC3R als auch für den MC4R jeweils einen Interaktionspartner bestätigt werden. Für die Appetitzuzeptoren GHSR/MC3R sowie für GPR7/MC4R konnte sowohl ein übereinstimmendes Verteilungsmuster als auch signifikante FRET-Effizienz in HEK293-Zellen gezeigt werden. In einem weiteren Säugerzellsystem (COS-7-Zellen) gelang mit Hilfe des Sandwich ELISA der Nachweis der entsprechenden Heterodimere.

Im Fall von NPY2R/MC3R und μ -OPR/MC3R konnte ebenfalls mittels ELISA die Formation eines Dimers gezeigt werden. Wohin gegen die niedrigen Werte der FRET-Untersuchungen nur auf eine Interaktion mit schwacher Affinität schließen lassen. Ebenso verhält es sich mit der Kombinatorik 5HTR_{1B} und MC4R.

Im weiteren Verlauf der hier dargelegten Arbeit steht die funktionelle Charakterisierung von MC3R und seinen Interaktionspartnern im Mittelpunkt.

3.1.5 Mechanismen der Dimerisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Die molekularen Mechanismen der Dimerisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind bislang nur teilweise aufgeklärt. Allgemein geht man von zwei Möglichkeiten der Interaktion aus: Disulfidbrücken zwischen zwei Cystein-Resten oder Interaktionen von Transmembrandomänen.

3.1.5.1 Disulfidbrücken

Da Disulfidbrücken möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Formation von Dimeren spielen, wurde für verschiedene Homo- als auch Heterodimere die FRET-Effizienz unter reduzierenden Bedingungen ermittelt. Dafür wurden transient kotransfizierte HEK293-Zellen vor der Bestimmung der Intensitätszunahme des Donorfluorochroms (CFP) während des Ausbleichens des Akzeptors (YFP-Fluorophor) für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 10 mM DTT inkubiert (Material & Methoden 2.5.2.1).

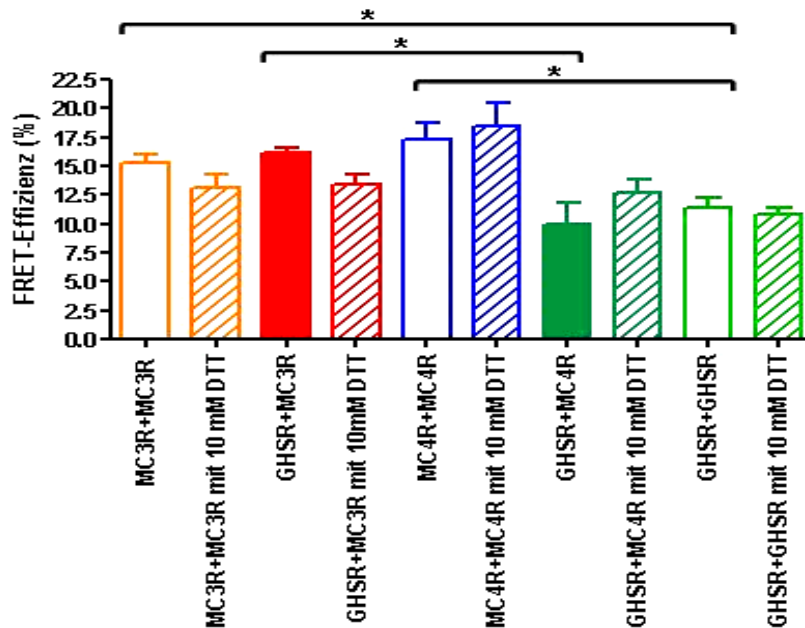


Abbildung 22: Effekt von DTT auf die FRET-Effizienz verschiedener Homo- und Heterodimerkombinatoriken in HEK293-Zellen

Die FRET-Effizienz von transient kotransfizierte HEK293-Zellen wurde über das Akzeptor-Bleichverfahren (Material & Methoden 2.5.2.1) in drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Um den Einfluß von Disulfidbrücken zwischen Cystein-Resten auf die Dimerisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zu untersuchen, wurde FRET in Abwesenheit und in Gegenwart von 10 mM DTT ermittelt. Mit ungefüllten Balken sind die FRET-Effizienzen bei Koexpression gleicher Rezeptoren (Homodimere: MC3R+MC3R *orange*, MC4R+MC4R *blau* und GHSR+GHSR *grün*) gekennzeichnet. Die gefüllten Balken zeigen die FRET-Effizienzen bei Koexpression von unterschiedlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Heterodimere: GHSR+MC3R *rot* und GHSR+MC4R *petrol*). Die nach der Inkubation (10 Minuten bei Raumtemperatur) 10 mM DTT gemessenen Daten sind durch gestreifte Balken hervorgehoben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

Die FRET-Effizienz der bereits unter 3.1.3 beschriebenen Homodimere der beiden Melanocortin-Rezeptoren MC3R und MC4R lag mit $15,2 \% \pm 0,9 \%$ und $17,3 \% \pm 1,9 \%$ deutlich über der des GHSR, welche $11,4 \% \pm 1,1 \%$ betrug (Abb. 22). Die Inkubation mit DTT bewirkte keine signifikante Veränderung dieser FRET-Signale. Lediglich eine schwache Reduktion der FRET-Effizienz des MC3R Homodimers konnte ermittelt werden.

Die deutlichen Unterschiede in den gemessenen FRET-Effizienzen für die Koexpressionsansätze GHSR+MC3R ($16,1 \% \pm 0,7 \%$) und GHSR+MC4R ($9,9 \% \pm 2,2 \%$) lassen vermuten, dass trotz der engen Verwandtschaft der beiden Melanocortin-Rezeptoren unterschiedliche Mechanismen bei der Interaktion mit GHSR eine Rolle spielen. Diese Vermutung wird u.a. dadurch bestätigt, dass nach der Inkubation mit DTT für HEK293-Zellen, welche GHSR und MC3R koexprimierten eine leichte Reduktion und im Falle der Koexpression von GHSR mit MC4R ein Anstieg der gemessenen FRET-Signale bestimmt werden konnte. Die Differenz betrug in beiden Fällen $2,7 \%$ gegen über den Kontrollmessungen ohne DTT-Behandlung.

3.1.5.2 Interaktion C-terminal trunkierter MC4R-Konstrukte (FRET)

Für die möglichen Interaktionen der Transmembrandomänen der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren im Zuge einer Dimerisierung werden. Derzeit zwei Modelle angenommen. Beim Modell der Kontakt-Dimere interagieren die Transmembrandomänen unter Aufrechterhaltung der Transmembranstruktur. Im zweiten Modell, dem Modell des Domänen-übergreifenden Dimers geht man vom Austausch einzelner Transmembrandomänen zwischen den Dimerisierungspartnern aus. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob einzelne Transmembrandomänen stärker in den Dimerisierungsprozess involviert sind als andere. Deshalb wurde mit Hilfe der FRET-Analyse die Interaktion von trunkierten und CFP- oder YFP-fusionierten MC4R-Konstrukte (Abb. 23B) mit dem ungekürzten MC4R in HEK293-Zellen bestimmt (siehe Material & Methoden 2.3.1.2 (b)).

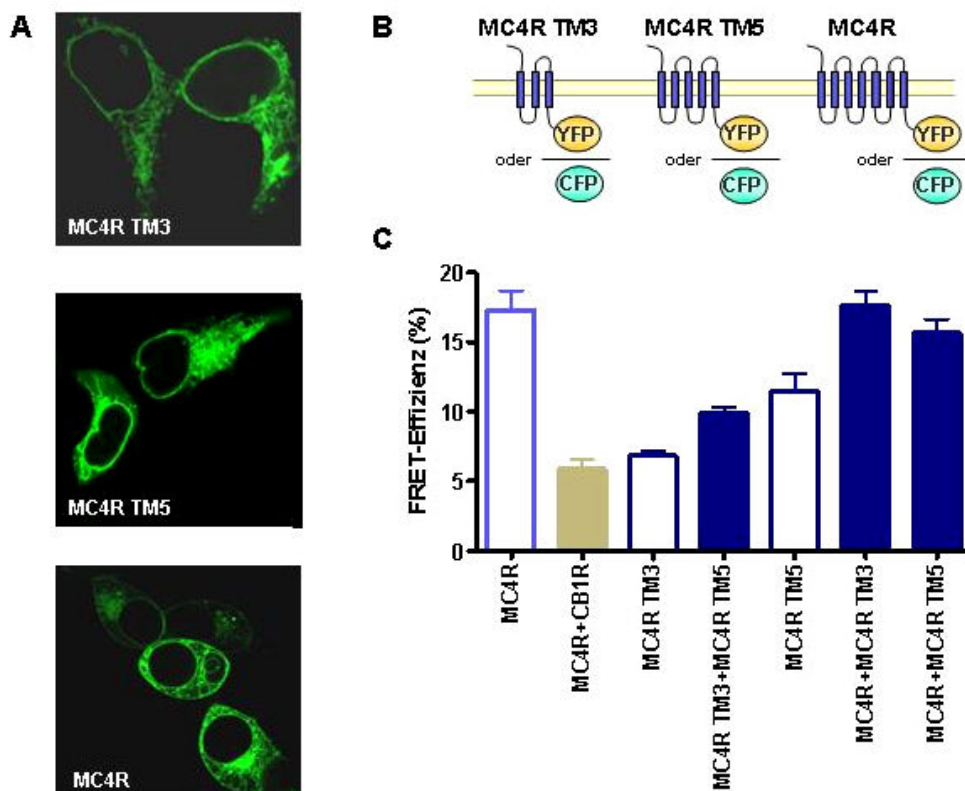


Abbildung 23: Assemblierungsfähigkeit C-terminal trunkierter MC4R-Konstrukte

A: Subzelluläre Lokalisation der C-terminal trunkierten und mit YFP fusionierten MC4R-Konstrukte in HEK293-Zellen. **B:** Schematische Darstellung der mittels PCR generierten und C-terminal verkürzten MC4R-Konstrukte. **C:** HEK293-Zellen wurden transient mit Expressionsplasmiden kotransfiziert, die für CFP- oder YFP-markierte Rezeptorkonstrukte kodieren. Die Bestimmung der FRET-Effizienz erfolgte wie bei Abb. 22 beschrieben nach dem Akzeptor-Bleichverfahren. Zur besseren Vergleichbarkeit ist die FRET-Effizienz bei Koexpression gleicher Konstrukte bzw. des MC4R Homodimere als ungefüllter Balken dargestellt. Die gefüllten Balken zeigen die FRET-Effizienz bei Koexpression von unterschiedlichen trunkierten Rezeptor-Konstrukten mit Wildtyp-MC4R oder einem anderen trunkierten MC4R-Konstrukt. Die Negativkontrolle (CB1R+MC4R) ist beige koloriert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von jeweils 3 unabhängigen Experimenten.

Es konnte beobachtet werden, dass mit zunehmender Anzahl der Transmembrandomänen der koexprimierten Rezeptor-Konstrukte auch die FRET-Effizienz anstieg (Abb. 23C). Dabei wurden Werte von 10-18 % gemessen, die auf eine stabile Dimerisierung schließen lassen. Allerdings konnte weder für das MC4R TM5- noch für das MC4R TM3-Konstrukt eine membranständige Lokalisation mittels Laser-Scanning-Mikroskopie ermittelt werden (Abb. 23A).

3.2 Funktionelle Charakterisierung der Interaktionen des MC3R

Für die funktionellen Analysen wurden COS-7-Zellen jeweils mit zwei unterschiedlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren im Verhältnis 1:1 transient kotransfiziert. Um vergleichbare Koexpressionbedingungen zu gewährleisten, wurde für die funktionelle Charakterisierung des MC3R Homodimers eine Koexpression mit rM3R (Ratten-muscarine Rezeptor 3) angesetzt. Dieser Rezeptor bildet nachweislich kein Heterodimer mit dem MC4R (Biebermann et al., 2003). Unveröffentlichte Studien dieser Arbeitsgruppe haben zudem gezeigt, dass der MC3R ebenfalls nicht mit rM3R dimerisiert. Der Ratten-muscarine Rezeptor 3 gehört aber ebenfalls zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und signalisiert über einen Gq-Protein-abhängigen Signaltransduktionsweg.

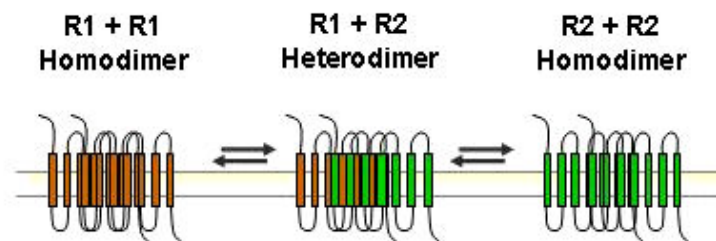


Abbildung 24: Illustration der möglichen Dimerformationen innerhalb eines Kotransfektionsansatzes

Es sollte beachtet werden, dass es in Abhängigkeit der Affinitäten der beiden exprimierten Rezeptoren (R1 und R2) neben der möglichen Formation von Heterodimeren (R1+R2) auch zur Ausbildung von Homodimeren (R1+R1, R2+R2) kommen kann. In einem Transfektionsansatz liegt dem zufolge ein Gemisch aus bis zu drei verschiedenen Dimeren vor (Abb. 24).

3.2.1 cAMP-Akkumulation

Zur funktionellen Charakterisierung des Heterodimers GHSR/MC3R sowie der Interaktion von NPY2R bzw. μ -OPR mit MC3R wurde der basale und nach der Stimulation mit den natürlichen Agonisten von MC3R (α -, β - und γ -MSH) induzierte intrazelluläre cAMP-Spiegel gemessen (Material & Methoden 2.6.2, Abb. 13). Die C-terminal markierten Fusionsplasmide wurden dafür modifiziert und das YFP-Epitop durch einen Flag-Tag ersetzt (Material & Methoden 2.3.1.2 (a)). Zwei Tag nach der transienten Kotransfektion von COS-7-Zellen wurde der cAMP-Assay durchgeführt, wobei pro Ansatz eine Dreifachbestimmung vorgenommen wurde. Insgesamt wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Für die funktionelle Charakterisierung des MC3R Homodimers wurde eine Koexpression mit rM3R (Ratten-muscarine Rezeptor 3) angesetzt. Dieser G-Protein-gekoppelter Rezeptor bildet keine Heterodimere mit MC3R (unveröffentlichte Ergebnisse vom Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie, Virchow-Klinikum Berlin, AG Biebermann) und fungiert somit als Negativkontrolle für die hier untersuchten Koexpressionen.

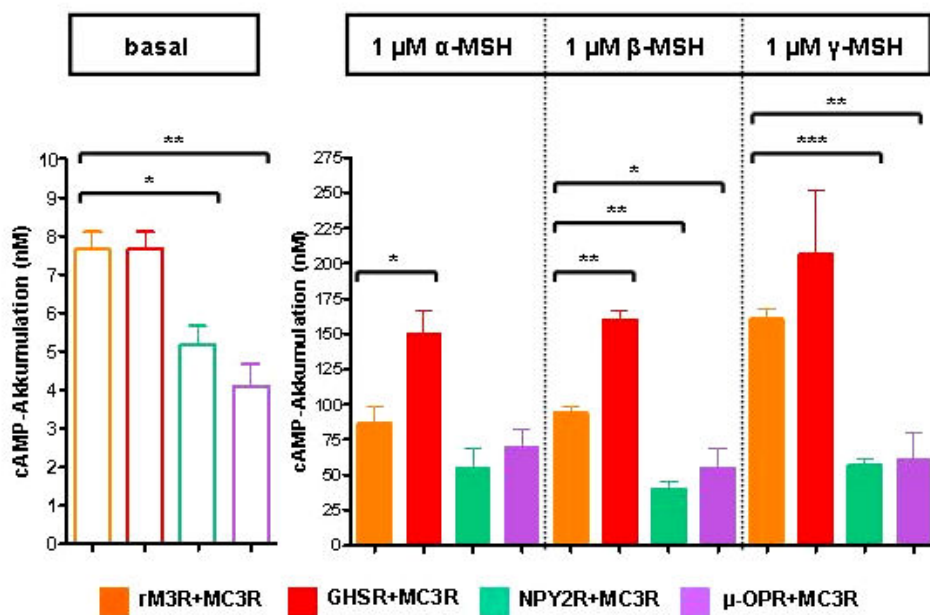


Abbildung 25: Funktionelle Charakterisierung der Koexpression des MC3R und dem GHSR, NPY2R oder μ -OPR

COS-7-Zellen wurden für den cAMP-Assay transient transfiziert (Material & Methoden 2.6.2). Dargestellt sind die basale (ungefüllte Balken) und nach der Stimulation mit 1 μ M alpha-, beta- oder gamma-MSH (gefüllte Balken) induzierte cAMP-Akkumulation für die Koexpression GHSR+MC3R (rot), NPY2R+MC3R (türkis) und μ -OPR+MC3R (lila). Um vergleichbare Expressionsbedingungen zu gewährleisten wurde MC3R zusammen mit rM3R ebenfalls im Verhältnis 1:1 transfiziert (orange). Unveröffentlichte Studien des Instituts für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie, Virchow-Klinikum Berlin, haben gezeigt, dass der MC3R nicht mit dem Ratten-muscarine Rezeptor 3 (rM3R) interagiert und daher als Negativkontrolle für Heterodimerisierungsstudien herangezogen werden kann. Die Ergebnisse von jeweils drei unabhängigen Experimenten (pro Ansatz Triplikate) des cAMP-Assays sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Der t-Test nach Student wurde zur Darstellung der signifikanten Unterschiede zum MC3R-Homodimer ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ ** bzw. $p < 0,005$ ***) durchgeführt.

Generell waren zwei Tendenzen bei der funktionellen Charakterisierung der Koexpressionen zu erkennen (Abb. 25). Die Stimulation des Heterodimers GHSR/MC3R sowohl mit α -, als auch mit β - und γ -MSH führte zu einem deutlichen Anstieg (bis zu 70 %, siehe auch Tabelle 1) des intrazellulären cAMP-Spiegels im Vergleich zur Koexpression rM3R+MC3R. Die maximale cAMP-Akkumulation nach Stimulation mit jeweils 1 μ M Agonist war in Zellen, welche NPY2R und MC3R bzw. μ -OPR und MC3R koexprimierten, hingegen um 40 bis zu 60 % reduziert. Darüber hinaus konnte eine Reduktion der basalen cAMP-Spiegel von COS-7-Zellen ermittelt werden, die entweder NPY2R und MC3R oder μ -OPR und MC3R koexprimierten.

Zur Bestimmung der Agonisten-Konzentration, die zu einer halbmaximalen cAMP-Akkumulation (EC_{50} -Wert) führt, wurde von allen Koexpressionspaaren Konzentrations-Wirkungskurven mit α -, β - und γ -MSH aufgenommen (siehe Material & Methoden 2.6.2). Die Bestimmung der EC_{50} -Werte und die graphische Darstellung erfolgte durch das Computerprogramm Graph Pad Prism (Abb. 26 und Tabelle 8).

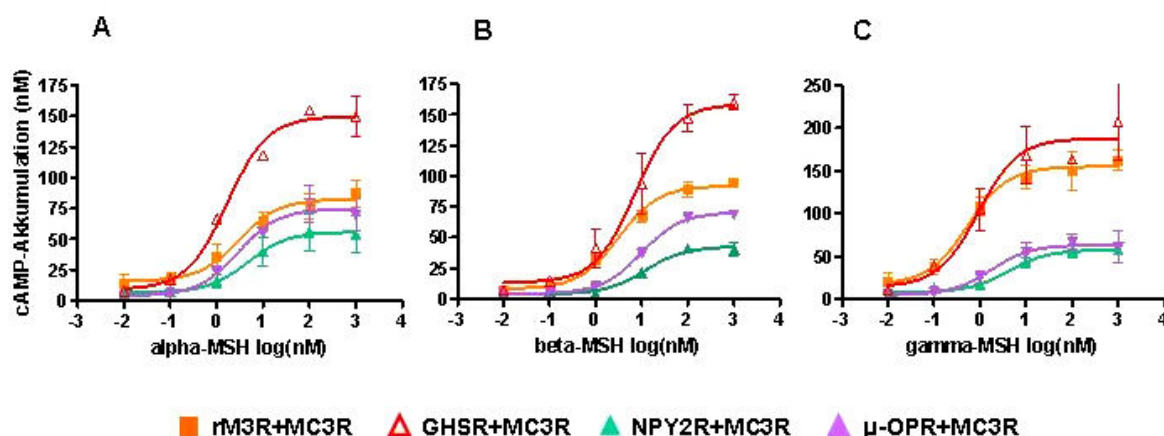


Abbildung 26: cAMP-Akkumulation der in COS-7-Zellen koexprimierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit MC3R nach der Stimulation mit verschiedenen Konzentration der Agonisten alpha- (A), beta- (B) und gamma-MSH (C)

Die cAMP-Akkumulationsassays wurden an COS-7-Zellen durchgeführt, die mit rM3R+MC3R (*orange*), GHSR+MC3R (*rot*), NPY2R+MC3R (*türkis*) oder μ -OPR+MC3R (*lila*) transient kotransfiziert wurden. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen α -, β - oder γ -MSH inkubiert und nach 30 Minuten der jeweils induzierte cAMP-Spiegel bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Experimenten, welche in Triplikaten durchgeführt wurden.

Die Ergebnisse der Konzentrations-Wirkungskurven der einzelnen Koexpressionspaare (Abb. 26) wurden in der Tabelle 8 zusammengefasst. Für die Koexpression von MC3R mit GHSR konnte im Vergleich zur Kombination rM3R+MC3R nach der Stimulation mit steigenden α -, β - und γ -MSH-Konzentrationen eine deutliche Erhöhung der cAMP-Produktion ermittelt werden. Der Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurven der beiden Ansätze macht deutlich, dass nur im Fall des

Agonisten β -MSH das GHSR/MC3R Heterodimer die zweifache Ligandenkonzentration benötigte um halbmaximale cAMP-Spiegel anzureichern. Hinsichtlich der Konzentrationen der beiden anderen eingesetzten Agonisten, die zu einer halbmaximalen cAMP-Akkumulation führen, konnten keine erheblichen Unterschiede festgestellt werden. Die Koexpression sowohl von NPY2R als auch von μ -OPR mit MC3R ergab jeweils eine reduzierte maximale Stimulation im Vergleich zur Kotransfektion von MC3R mit rM3R. Die EC_{50} -Werte für die Kotransfektionen NPY2R+MC3R und μ -OPR+MC3R zeigen im Vergleich zur Kombinatorik rM3R+MC3R hinsichtlich der Agonisten β - und γ -MSH ebenfalls eine deutliche Verschiebung zu höheren Liganden-Konzentrationen.

Tabelle 8: Ergebnisse der Bestimmung der cAMP-Akkumulation für Koexpressionen verschiedener G-Protein-gekoppelter Rezeptoren der hypothalamischen Appetitregulation mit MC3R in COS-7-Zellen

		rM3R+MC3R	GHSR+MC3R	NPY2R+MC3R	μ -OPR+MC3R
α -MSH	basal (nM)	14,05 \pm 9,71	7,71 \pm 1,38	5,9 \pm 0,3	3,73 \pm 0,1
	E_{max}/E_{max}	100	171,7	62,11	80,11
	rM3R+MC3R				
	(%)				
	EC_{50} (nM)	3,0	1,7	3,8	2,9
β -MSH	basal (nM)	6,84 \pm 1,03	6,89 \pm 1,28	4,83 \pm 4,38	4,6 \pm 1,84
	E_{max}/E_{max}	100	169,6	42,27	72,47
	rM3R+MC3R				
	(%)				
	EC_{50} (nM)	3,2	7,2	11,9	9,8
γ -MSH	basal (nM)	6,82 \pm 3,76	8,4 \pm 3,06	4,31 \pm 1,84	4,64 \pm 3,35
	E_{max}/E_{max}	100	129,16	35,83	37,86
	rM3R+MC3R				
	(%)				
	EC_{50} (nM)	0,54	0,62	4,1	1,7

Aus diesen Resultaten konnte geschlossen werden, das die Stimulation des MC3R innerhalb der verschiedenen Kombinatoriken die charakteristische Signaltransduktion dieses G-Protein-gekoppelten Rezeptors, die Aktivierung der Adenylat-Cyclase und die Freisetzung des second messenger cAMP (3', 5'-cyclo-Adenosin-monophosphat), bewirkt. Die Unterschiede in den daraus resultierenden intrazellulären cAMP-Spiegeln lassen eine Interaktion zwischen dem aktivierten MC3R und dem jeweils koexprimierten Rezeptor vermuten, welche einen Einfluß auf die MC3R-abhängige cAMP-Akkumulation hat.

In den weiteren Studien wurde zunächst vorrangig die Interaktion des GHSR/MC3R Heterodimers funktionell untersucht.

3.3 GHSR/MC3R Heterodimer

3.3.1 Bestimmung der intrazellulären Inositolphosphat (IP)-Akkumulation

Die Bindung des Peptidhormons Ghrelin an den GHSR initiiert die Interaktion mit einem Gq/11-Protein, dessen Aktivierung einen Phospholipase-C-vermittelten (PLC) Signalweg anschaltet. Die anschließende Signaltransduktion führt sowohl über einen erhöhten Umsatz von Inositoltriphosphat als auch über eine Proteinkinase-C-Aktivierung zur letztendlichen Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern der Zelle. Um die Funktionalität des heterolog exprimierten GHSR zu überprüfen wurde ein IP-Akkumulationsassay (Material & Methoden 2.6.3) durchgeführt.

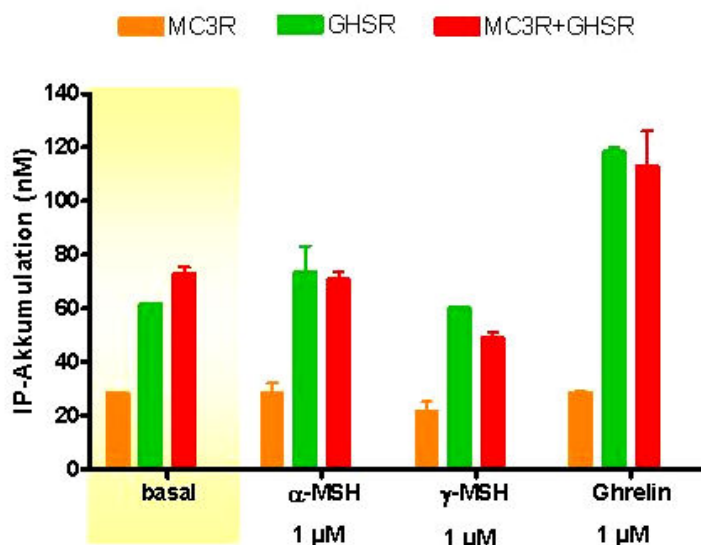


Abbildung 27: IP-Akkumulation der Homodimere MC3R und GHSR sowie des GHSR/MC3R Heterodimers

COS-7-Zellen wurden für den IP-Assay transient transfiziert (Material & Methoden 2.6.3). Dargestellt sind die basale (gelb unterlegt) und nach der Stimulation mit 1 μM alpha-, gamma-MSH oder Ghrelin induzierte cAMP-Akkumulation für die Koexpression GHSR+MC3R (rot). Darüber hinaus wurde die Funktionalität des heterolog exprimierten GHSR (grün) überprüft. Ebenfalls wurde das MC3R Homodimer (orange) hinsichtlich der IP-Akkumulation in Abhängigkeit von unterschiedlichen Liganden untersucht. Die Ergebnisse von einem repräsentativen Experiment (pro Ansatz Duplikate) sind als Mittelwerte ± SD angegeben und wurden in Zusammenarbeit mit Claudia Stäubert, vom Institut für Biochemie an der Universität Leipzig erstellt.

Die für den GHSR als auch für das GHSR/MC3R Heterodimer gemessenen erhöhten basalen IP-Akkumulationen ließen auf eine konstitutive Aktivierung des Rezeptors in Abwesenheit des Liganden schließen, wie sie bereits von Schwartz und Mitarbeitern 2003 beschrieben wurde. Eine signifikante Erhöhung des IP-Spiegels konnte nur für COS-7-Zellen ermittelt werden, die entweder den GHSR allein oder das GHSR/MC3R Heterodimer exprimierten und vor der Durchführung des IP-Assay für eine Stunde mit 1 μM Ghrelin, dem endogenen Agonisten des GHSR, stimuliert wurden (Abb. 27).

3.3.2 cAMP-Stimulation nach Kostimulation des Heterodimers

Nach den bisherigen Daten, die eine Interaktion zwischen dem aktivierten MC3R und dem nicht aktivierten GHSR innerhalb des Heterodimers zeigen (siehe Abb. 25 und 26), stellte sich die Frage, ob die zusätzliche Stimulation des GHSR auf den cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweg einen Einfluss hat.

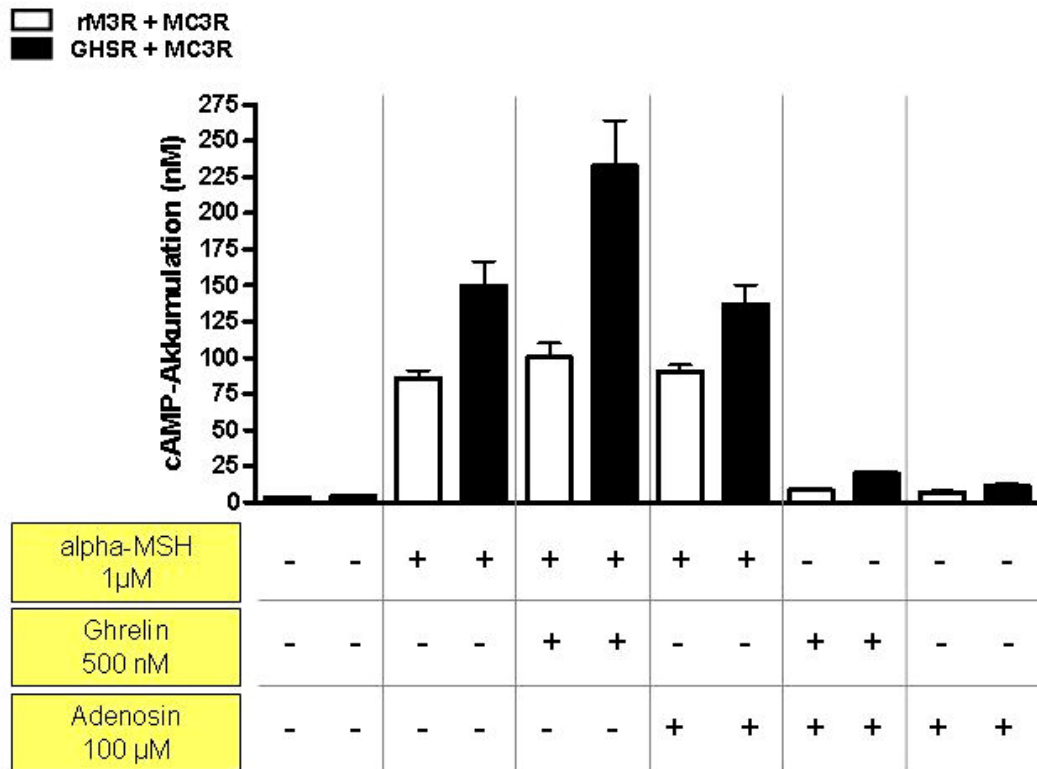


Abbildung 28: Bestimmung der cAMP-Akkumulation in Abhängigkeit von unterschiedlicher Liganden

COS-7-Zellen wurden mit rM3R+MC3R (Homodimer, ungefüllte Balken) und GHSR+MC3R (Heterodimer, gefüllte Balken) transient kotransfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen mit unterschiedlichen Liganden und Ligandenkombinationen für 30 Minuten bei 37 °C stimuliert. Die Ergebnisse des funktionellen Assays sind als Mittelwerte \pm SD einer repräsentativen Einzelmessung mit Triplikaten angegeben.

Zunächst wurde der Effekt von unterschiedlichen Ligandenkombinationen auf die intrazelluläre cAMP-Akkumulation untersucht. Neben α -MSH, als ein Agonist des MC3R, wurde das Peptidhormone Ghrelin, welches der endogene Ligand des GHSR ist, auch Adenosin zur Stimulation von COS-7-Zellen eingesetzt, die entweder das Homodimer (rM3R+MC3R) oder das Heterodimer (GHSR+MC3R) exprimieren.

Carriera und Mitarbeiter (2004) beschrieben die Aktivierung der Adenylat Cyclase durch die Stimulation von stabil GHSR-exprimierenden HEK293-Zelllinien mit Adenosin als auch mit Adenosin und Ghrelin. Ein solcher positiver Effekt auf die intrazelluläre cAMP-Akkumulation konnte für das GHSR/MC3R Heterodimer nicht bestimmt werden (Abb. 28).

Da nur die Stimulation mit 1 μ M α -MSH und 500 nM Ghrelin zu einer signifikanten Erhöhung des cAMP-Spiegels führte, wurde für diese Ligandenkombination eine Konzentrations-Wirkungskurve angesetzt. Dafür wurden transient kotransfizierte COS-7-Zellen in Gegenwart

einer konstanten Konzentration eines MC3R-Agonisten mit einer ansteigenden Ghrelinkonzentration für 30 Minuten bestimmt (Material & Methoden 2.6.2).

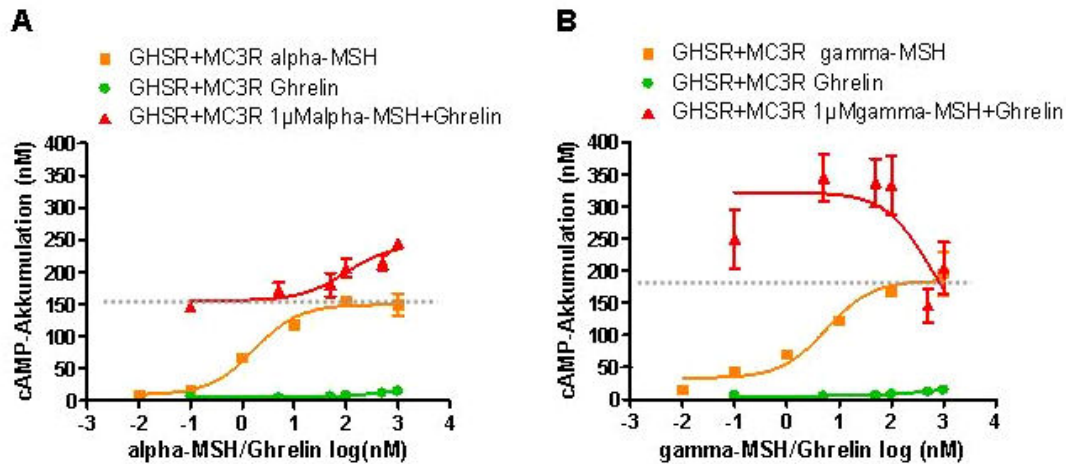


Abbildung 29: Ghrelin stimulierte cAMP-Akkumulation in Gegenwart von 1 µM alpha- (A) oder 1 µM gamma-MSH (B)

Für die Bestimmung der intrazellulären cAMP-Akkumulation wurden COS-7-Zellen, welche GHSR und MC3R koexprimierten, mit einer konstanten Konzentration von 1 µM alpha- oder gamma-MSH und zur gleichen Zeit mit einer steigenden Konzentrationen Ghrelin für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der induzierte cAMP-Spiegel bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Experimenten, welche in Triplikaten durchgeführt wurden. Zum Vergleich wurde sowohl die Konzentrations-Wirkungskurve mit α - bzw. γ -MSH (orangener Graph, Maximum durch gestrichelte Linie gekennzeichnet) als auch mit dem GHSR-Agonisten Ghrelin (grüner Graph) für das GHSR/MC3R Heterodimer aufgeführt. Die graphische Darstellung der Doppel-Stimulation mit α - bzw. γ -MSH und Ghrelin ist jeweils in rot gehalten.

Durch die zusätzliche Stimulation des GHSR im Zusammenhang mit der Aktivierung des MC3R durch α -MSH konnte eine nochmalige Erhöhung der intrazellulären cAMP-Akkumulation beobachtet werden (Abb. 29A). Proportional zur steigenden Ghrelinkonzentration wurde ein Anstieg der Konzentration des second messengers gemessen (monophasische Konzentrations-Wirkungskurve). Ein biphasische Konzentrations-Wirkungskurve ergab dagegen eine konstante Konzentration von 1 µM γ -MSH (Abb. 29B). Mit niedrigen Ghrelinkonzentration (5-50 nM) wurde hier zunächst ein Anstieg und dann mit steigenden Ligandenkonzentrationen (ab 100 nM Ghrelin) eine deutliche Reduktion der intrazellulären cAMP-Spiegel gemessen.

3.3.3 Ligandenbindung

Zur Untersuchung der Ligandenbindung an das MC3R Homodimer und das GHSR/MC3R Heterodimer und zur Bestimmung der Liganden-Konzentration, bei der 50 % der Rezeptoren mit Ligand beladen sind (K_i -Wert) wurden Radioliganden-Bindungsuntersuchungen mit 125 I-NDP- α -

MSH ($[^{125}\text{I}][\text{Nle}^4, \text{d-Phe}^7]\text{-}\alpha\text{-Melanocyten-stimulierendes Hormon}$) an transient kotransfizierten COS-7-Zellen durchgeführt (Material & Methoden 2.6.1).

Die in der Abb. 30 dargestellten Ergebnisse der Bindungsstudien mit den unterschiedlichen Liganden machen deutlich, dass das GHSR/MC3R Heterodimer im Vergleich zum MC3R Homodimer eine geringere Konzentration an unmarkiertem Ligand benötigt, um 50 % spezifisch gebundenes ^{125}I -NDP- α -MSH vom Rezeptor zu verdrängen. Dies deutet auf eine bessere Bindung der untersuchten Liganden (NDP- α -MSH, α -, β - und γ -MSH) an den MC3R innerhalb des Heterodimers hin, wobei allerdings insgesamt weniger Ligand gebunden wird.

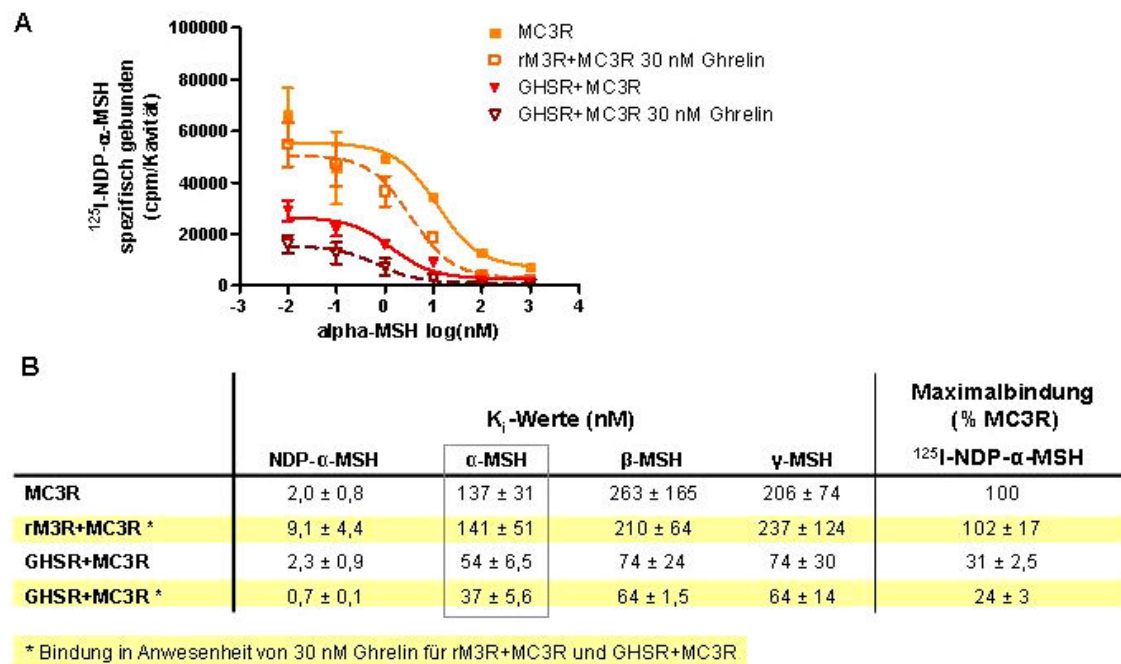


Abbildung 30: ^{125}I -NDP- α -MSH-Bindungsstudien an MC3R und GHSR+MC3R exprimierenden COS-7-Zellen

Die Bindungsstudien wurden an COS-7-Zellen durchgeführt, die mit MC3R bzw. rM3R+MC3R sowie GHSR+MC3R transient kotransfiziert wurden. Die Zellen wurden mit radioaktivem ^{125}I -NDP- α -MSH inkubiert und dieses dann mit steigenden Konzentrationen von unmarkiertem NDP- α -MSH, α -, β - oder γ -MSH in Abwesenheit (gefüllte Symbole) und Anwesenheit von 30 nM Ghrelin (ungefüllte Symbole) verdrängt. Unter **A**: ist die Bindungsstudie mit α -MSH aufgeführt. Die ermittelten K_i -Werte, d.h. die Konzentration an unmarkiertem Liganden, die in der Lage ist, 50 % des spezifisch gebundenen ^{125}I -NDP- α -MSH zu verdrängen und die maximalen Bindung des radioaktiv-markierten Liganden wurden in Tabellenform unter **B** zusammengefasst. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten, welche in Dublikaten durchgeführt wurden.

3.3.4 Charakterisierung des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges des GHSR/MC3R Heterodimers

In den bisherigen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des GHSR/MC3R Heterodimers mit den endogenen Agonisten des MC3R α -, β - und γ -MSH zur Aktivierung des für diesen G-Protein-gekoppelten Rezeptor charakteristischen G_s -abhängigen Signaltransduktionsweg bewirkt (siehe 3.2.1). Dabei wurde im Vergleich zum MC3R Homodimer ein Anstieg der induzierten cAMP-Produktion beobachtet, der möglicherweise durch die spezifisch hohe Liganden-unabhängige Aktivität des GHSR hervorgerufen wird (siehe 3.3.1). Das Vorhandensein eines so genannten „cross talks“ zwischen dem G_{α_s} -abhängigen Signaltransduktionsweg des MC3R und dem $G_{\alpha_{q/11}}$ -abhängigen Signaltransduktionsweg des GHSR (Abb. 31) wurde auch deutlich durch die Ergebnisse der Kostimulation des Heterodimers mit α -MSH und Ghrelin (siehe 3.3.2).

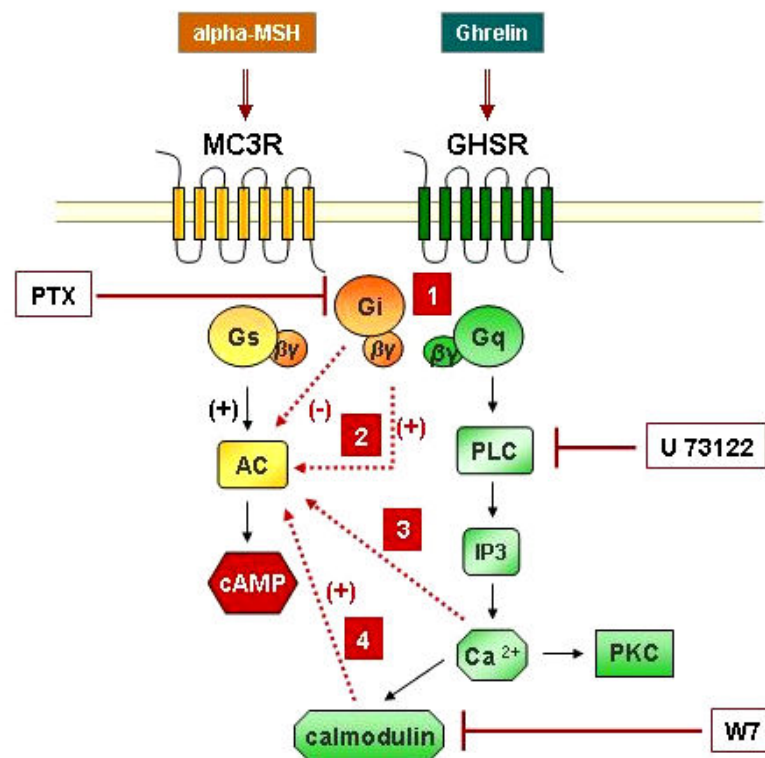


Abbildung 31: Graphische Darstellung unterschiedlicher Interaktionsmöglichkeiten zwischen dem Signaltransduktionsweg des MC3R und des GHSR

Die aufgestellten hypothetischen Interaktionen zwischen dem G_{α_s} -abhängigen (MC3R, Farbcod: orange) und dem $G_{\alpha_{q/11}}$ -abhängigen (GHSR, Farbcod: grün) Signaltransduktionsweg wurden als rote Pfeile dargestellt. Die verwendeten Inhibitoren (Pertussistoxin, PTX; U-73122, PLC-Inhibitor und W7, Calmodulin-Inhibitor) wurden dem jeweils gehemmten Enzym zugeordnet.

Die Aktivierung bzw. Inaktivierung der Adenylat-Cyclase wird nicht nur durch die α -Untereinheit der G_s - bzw. G_i -Proteine reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass auch der $\beta\gamma$ -Komplex der G-Proteine einen regulatorischen Einfluß auf die Aktivität dieses Membran-gebundene Enzym hat. Calcium und Calmodulin sind weitere wichtige Effektoren der Adenylat-Cyclase (Sunahara & Taussing, 2002). Die vielfältigen Regulationen der Aktivität der Adenylat-Cyclase machen dieses Enzym zu einem potentiellen Knotenpunkt innerhalb des Heterodimers. In der Abbildung 31 sind die beteiligten Signaltransduktionswege der beiden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zusammengefasst dargestellt. Durch den Einsatz unterschiedlicher Inhibitoren wurde versucht eine funktionelle Charakterisierung des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges des GHSR/MC3R Heterodimers vorzunehmen. Folgende hypothetische Interaktionswege wurden dafür aufgestellt und in der Abb. 31 in Form von roten Pfeilen graphisch verdeutlicht:

- (1) Heterodimer-bedingte Veränderung der G-Protein-Kopplung
- (2) Transaktivierung der Adenylat-Cyclase durch $G\beta\gamma$ -Komplex (Superaktivierung)
- (3) Stimulation der Aktivität der Adenylat-Cyclase durch Ca^{2+} -Ionen und PKC
- (4) Stimulation der Aktivität der Adenylat-Cyclase durch Calmodulin

3.3.4.1 Nachweis der Isoformen der Adenylat-Cyclase in COS-7-Zellen

Die einzelnen Isoformen der Adenylat-Cyclase werden gewebespezifisch exprimiert. Im Zuge der Charakterisierung des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges des GHSR/MC3R Heterodimers wurde daher das Verteilungsmuster für die hier verwendete Säugerzelllinie bestimmt. Die Expression der einzelnen Isoformen der Adenylat-Cyclase in COS-7-Zellen wurde mittels RT-PCR auf der Transkriptionsebene überprüft (Material & Methoden 2.3.2). Die über Gradienten-PCR (Annealing-Temperatur von 50–70 °C) amplifizierten Fragmente wurden zur Sequenzierung in einen TOPO-Vektor kloniert. Die entsprechenden Banden mit einer Größe von ca. 400bp sind in der Abb. 32 zu erkennen.

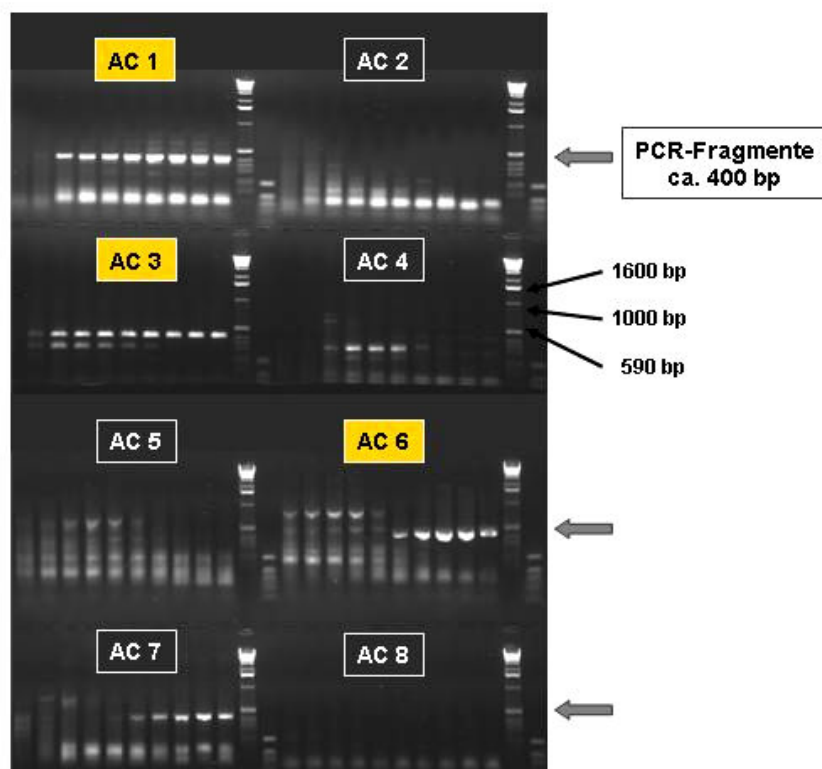


Abbildung 32: Ergebnisse der Gradienten-RT-PCR.

Die mittels RT-PCR amplifizierten Fragmente wurden im Anschluß an die Reaktion in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Die Oligonukleotide wurden jeweils so gewählt, dass sie ein Fragment von ca. 400bp erfassen. Da für jede Probe mehrere PCR-Reaktionen mit steigender Annealing-Temperatur (50-70 °C) durchgeführt wurden, konnten jeweils mehrere Banden mit der richtigen Größe ausgeschnitten, gepoolt und für die Klonierung aufgereinigt werden. Für jede Probe wurden anschließend 4-5 Klone sequenziert. Die mittels Sequenzierung nachgewiesenen Isoformen sind *orange* unterlegt.

3.3.4.2 Effekt von Pertussistoxin (PTX) auf die cAMP-Akkumulation des MC3R

Homodimers und des GHSR/MC3R Heterodimers

Pertussistoxin wird von dem Bakterium *Bordetella pertussis* ausgeschieden und gehört zu den so genannten AB-Toxinen, die aus einer A-Untereinheit, welche die katalytische Aktivität besitzt und einer B-Untereinheit, die die spezifische Bindung an die Oberfläche eukaryontischer Zellen vermittelt, bestehen. Der aktivierte A-Teil des Toxins katalysiert nach der Aufnahme in die Zelle die ADP-Ribosylierung von G-Protein der Zielzelle, wodurch letztere inaktiviert werden. Im Fall von PTX wird der ADP-Ribosylrest an einen Cystein-Rest des inhibitorischen $G\alpha_i$ -Proteins ($G\alpha_i$ -Protein) gehängt. Zelllinien, die mit diesem Inhibitor behandelt wurden zeigen einen deutlichen Anstieg der Liganden-abhängigen cAMP-Akkumulation, da die modifizierten G_i -Proteine die Hemmung der Adenylat-Cyclase nicht mehr aufrecht erhalten können. Im Falle einer Kostimulation durch die $G\alpha_s$ -Untereinheit und die $G\beta\gamma_i$ -Untereinheit bewirkt die Behandlung mit PTX eine Reduktion des intrazellulären cAMP-Spiegels.

Zur funktionellen Charakterisierung wurden COS-7-Zellen entweder mit dem MC3R Homodimer (rM3R+MC3R) oder dem GHSR/MC3R Heterodimer transient kotransfiziert. Mindestens 20 Stunden vor der Stimulation mit den jeweiligen Liganden und dem cAMP-Akkumulationsassay wurden die Zellen mit 500 nM PTX bei 37 °C inkubiert.

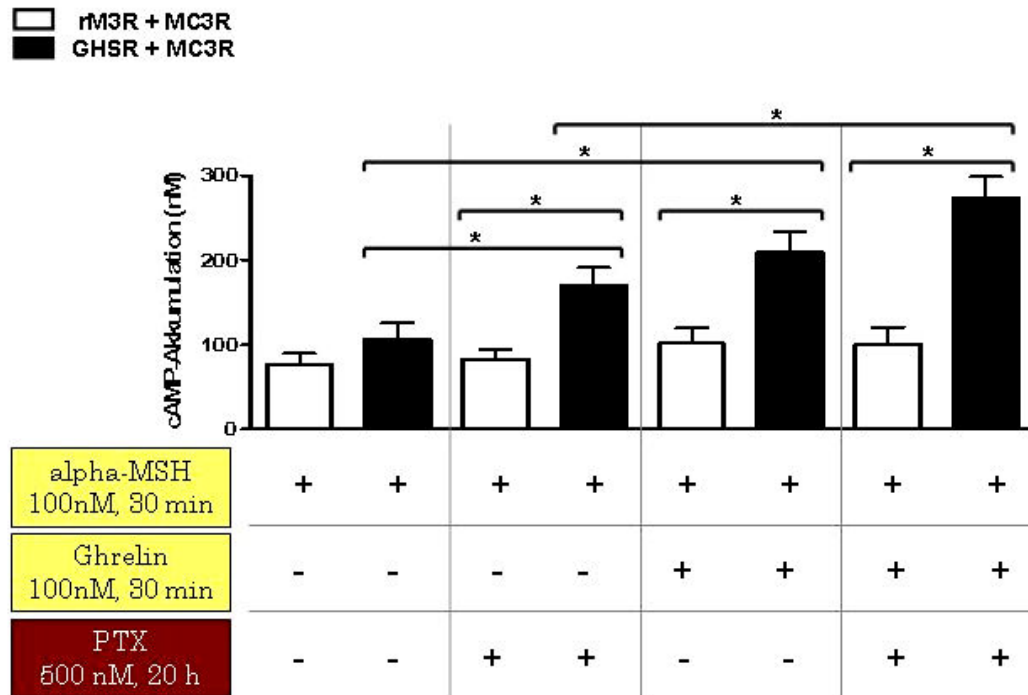


Abbildung 33: Effekt von PTX (Pertussistoxin) auf die cAMP-Akkumulation des GHSR/MC3R Heterodimers

COS-7-Zellen wurden mit rM3R+MC3R (Homodimer, ungefüllte Balken) und GHSR+MC3R (Heterodimer, gefüllte Balken) transient kotransfiziert. Einen Tage nach der Transfektion wurden die Zellen für mindestens 20 Stunden mit dem Inhibitor PTX (Pertussistoxin) bei 37 °C inkubiert, bevor sie mit den verschiedenen Liganden für 30 Minuten stimuliert wurden. Im Anschluß erfolgte die Bestimmung der induzierten cAMP-Spiegel. Die Ergebnisse des funktionellen Assays sind als Mittelwerte \pm SD drei unabhängiger Einzelmessungen (pro Ansatz in Triplikaten) angegeben. Der t-Test nach Student wurde zur Darstellung der jeweiligen signifikanten Unterschiede durchgeführt ($p < 0,05$ *).

Eine signifikante Veränderung der α -MSH-induzierten cAMP-Akkumulation im Anschluß an die Inkubation mit PTX konnte für die Koexpression rM3R+MC3R nicht ermittelt werden (Abb. 33), was darauf schließen lässt, dass durch das Homodimer G_i -Proteine nicht aktiviert werden. Der cAMP-abhängige Signaltransduktionsweg wird demzufolge ausschließlich über die Aktivierung von G_s -Proteinen gesteuert.

Der für das GHSR/MC3R Heterodimer ermittelte Anstieg der cAMP-Spiegel sowohl nach der Stimulation mit 100 nM α -MSH als auch nach der Doppel-Stimulation mit jeweils 100 nM α -MSH und Ghrelin im Anschluß an die PTX-Behandlung resultiert aus der Hemmung der Aktivierung der inhibitorischer G-Proteine (Abb. 33). Die Erhöhung der cAMP-Produktion in

Gegenwart von PTX, d.h. die Gi-Aktivierung über das Heterodimers, erfolgte in beiden Fällen im gleichen Umfang. Sie lag zwischen dem 1,3- bis 1,6-fachen des Liganden-induzierten cAMP-Spiegels in Abwesenheit von PTX. Die Interaktion des Heterodimers mit G_i-Proteinen erfolgt scheinbar unabhängig von der Liganden-abhängigen Aktivierung des GHSR. Eine Transaktivierung der Adenylat-Cyclase durch den Gβγ_i-Komplex konnte nicht beobachtet und daher an dieser Stelle ausgeschlossen werden.

3.3.4.3 Effekt von U-73122 auf die cAMP-Akkumulation des GHSR/MC3R Heterodimers

Die Regulation der Phospholipase C (PLC), welche die Freisetzung von zwei second messengern, Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG), katalysiert, wird durch die Familie der Gα_{q/11}-Proteine vermittelt. Die IP₃-Konzentration im Zytoplasma bestimmt die Öffnungswahrscheinlichkeit von Ionenkanälen und bewirkt so die Rezeptor-vermittelte Erhöhung von Ca²⁺-Ionen in der Zelle. Da Calcium einen regulatorischen Effekt auf einige Isoformen der Adenylat-Cyclase hat, wurden transient kotransfizierte COS-7-Zellen im Anschluß an eine 30-minütige Inkubation mit dem PLC-Inhibitor U-73122 mit 100 nM α-MSH oder mit jeweils 100 nM α-MSH und Ghrelin stimuliert und die induzierten cAMP-Spiegel gemessen.

Erfolgte die α-MSH-abhängige cAMP-Akkumulation des MC3R Homodimers und des GHSR/MC3R Heterodimers in Gegenwart von U-73122, so konnte eine leichte, aber nicht signifikante Erhöhung der gemessenen cAMP-Konzentrationen im Vergleich zu den Ansätzen ohne den PLC-Inhibitor bestimmt werden (Abb. 34).

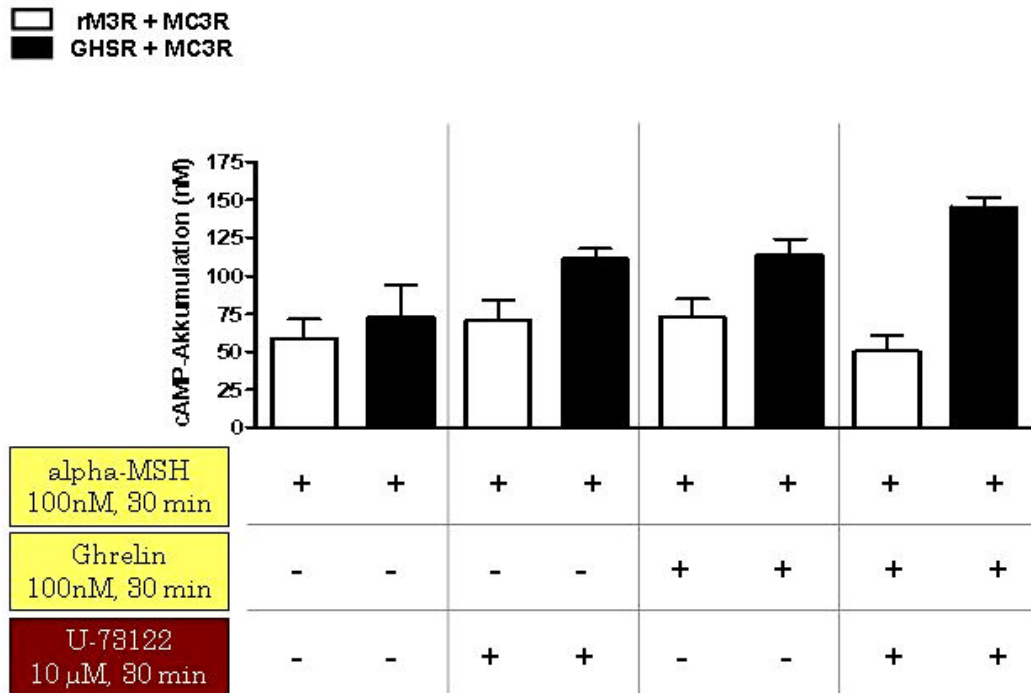


Abbildung 34: Effekt von U-73122 (Phospholipase C-Inhibitor) auf die cAMP-Akkumulation des GHSR/MC3R Heterodimers

COS-7-Zellen wurden mit GHSR+MC3R (Heterodimer, gefüllte Balken) oder dem MC3R Homodimer (ungefüllte Balken) transient kotransfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen zunächst 30 Minuten mit dem PLC-Inhibitor U-73122 präinkubiert. Bevor die Auswertung der cAMP-Spiegel mittels AlphaScreen-basiertem Assay erfolgte, wurde die Stimulation mit den verschiedenen Liganden für 30 Minuten bei 37 °C durchgeführt. Die Ergebnisse des funktionellen Assays sind als Mittelwerte \pm SD drei unabhängiger Einzelmessung (pro Ansatz in Triplikaten) angegeben.

Die Inkubation mit U-73122 im Vorfeld der Kostimulation mit je 100 nM α -MSH und Ghrelin des Koexpressionsansatzes GHSR+MC3R bewirkt ebenfalls einen Anstieg der ermittelten intrazellulären cAMP-Spiegel. Diese Resultate verdeutlichen den möglichen inhibitorischen Effekt des Calciums auf die Aktivität der Adenylat-Cyclase in dem hier untersuchten Signaltransduktionssystem des Heterodimers.

Eine Auswertung der in Abb. 34 graphisch zusammengefassten Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten mit Hilfe des t-Tests nach Student ergab keine Signifikanz für die beschriebenen Unterschiede der einzelnen Ansätze.

3.3.4.4 Effekt des Calmodulin-Inhibitors W7 (N-(6-Aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide hydrochloride) auf die cAMP-Akkumulation des GHSR/MC3R Heterodimers

Calmodulin (CaM) verfügt über vier Bindungsstellen für Calcium und ist in der Lage verschiedene Proteine und Enzyme in eukaryontischen Zellen in Gegenwart von Calcium zu aktivieren. Ihm wird daher auch eine Funktion als Calcium-Sensor zugeschrieben. Neben dem regulatorischen Einfluss von Calmodulin auf die Aktivität der Adenylat-Cyclase wurde kürzlich auch die direkte Interaktion mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren beschrieben (Zhang et al., 2005).

Für diesen Versuchsansatz wurden die Liganden-abhängige cAMP-Produktion transient kotransfizierter COS-7-Zellen in Abwesenheit und nach einer 15-minütigen Inkubation mit dem Calmodulin-Inhibitor W7 (N-(6-Aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide hydrochloride) bestimmt.

Für die Einzelstimulation mit 100 nM α -MSH sowohl für das MC3R Homodimer als auch für das GHSR/MC3R Heterodimer wurde eine signifikante Reduktion der cAMP-Spiegel nach der Präinkubation mit 100 μ M W7 ermittelt (Abb. 35). Auch die durch die Kostimulation mit jeweils 100 nM α -MSH und 100 nM Ghrelin induzierten cAMP-Spiegel wurden aufgrund der Hemmung von Calmodulin durch W7 deutlich erniedrigt.

Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass Calmodulin eine wichtige Rolle innerhalb des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges des MC3R Homodimeres und des GHSR/MC3R Heterodimeres spielt.

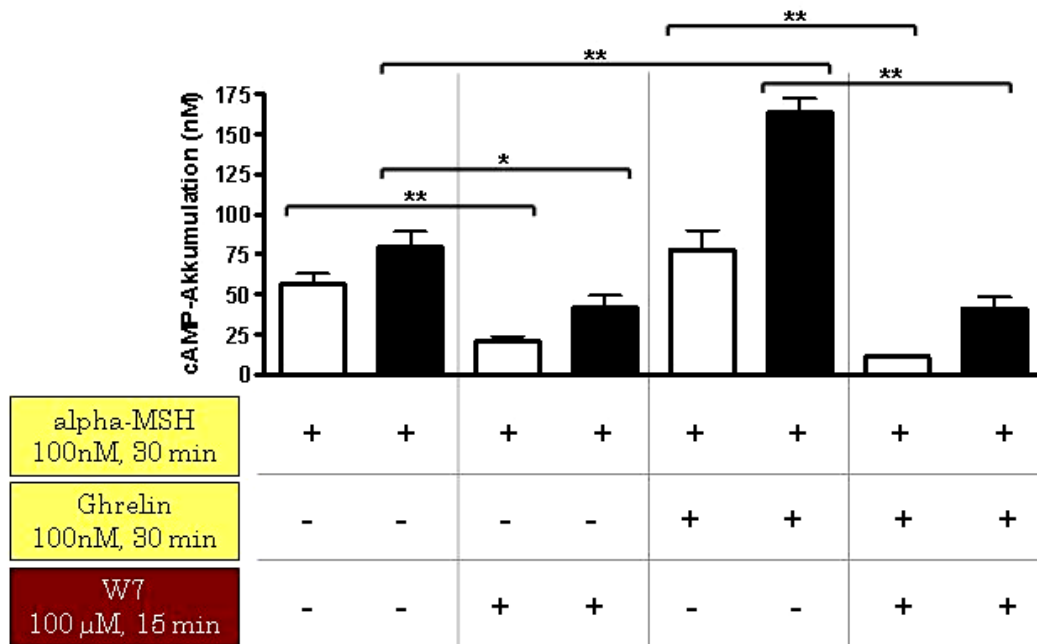


Abbildung 35: Effekt von W7 (Calmodulin-Inhibitor) auf die cAMP-Akkumulation des GHSR/MC3R Heterodimers

COS-7-Zellen wurden mit GHSR+MC3R (Heterodimer, gefüllte Balken) oder dem MC3R Homodimer (ungefüllte Balken) transient kotransfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen zunächst 15 Minuten mit dem Calmodulin-Inhibitor W7 präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit α -MSH, Ghrelin sowie α -MSH und Ghrelin (jeweils 100 nM) für 30 Minuten stimuliert. Die Auswertung der cAMP-Spiegel erfolgte mittels AlphaScreen-basiertem Akkumulationsassay. Die Ergebnisse des funktionellen Assays sind als Mittelwerte \pm SD drei unabhängiger Einzelmessung (pro Ansatz in Triplikaten) angegeben. Der t-Test nach Student wurde zur Darstellung der jeweiligen signifikanten Unterschiede durchgeführt ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **).

3.3.5 Heterodimerisierung und funktionelle Charakterisierung der MC3R- und GHSR-Mutanten

Um die Interaktion zwischen GHSR und MC3R innerhalb des Heterodimers besser zu verstehen wurden die natürlich vorkommenden Mutationen, welche für die beiden Appetitrezeptoren bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen charakterisiert und beschrieben wurden für Koexpressionsstudien herangezogen.

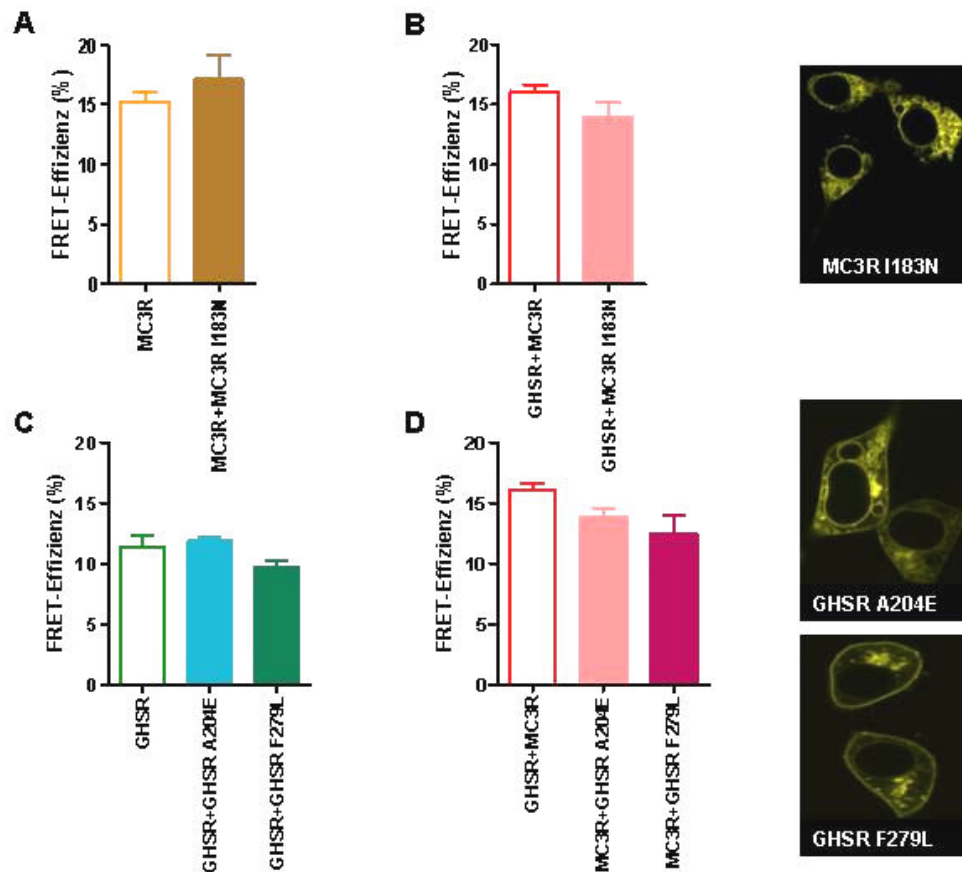


Abbildung 36: Interaktionsverhalten der MC3R-Mutante I183N (A+B) und der GHSR-Mutanten A204E und F279L (C+D) mit GHSR oder MC3R

HEK293-Zellen wurden transient mit Expressionsplasmiden kotransfiziert, die für den YFP-fusionierten GHSR oder MC3R und die CFP-markierten Mutanten MC3R I183N (**A+B**), GHSR A204E und GHSR F279L (**C+D**) kodieren. Die FRET-Effizienz wurde über das Akzeptor-Bleichverfahren bestimmt (siehe Material & Methoden 2.5.2.1). Zur besseren Vergleichbarkeit sind die Koexpressionen MC3R/MC3R und GHSR/GHSR (Monodimere) sowie GHSR/MC3R (Heterodimer) mit ungefüllten Balken markiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (SEM) von jeweils 3 unabhängigen Experimenten. Die konfokalen Bilder zeigen die Expression und subzelluläre Lokalisationen der unterschiedlichen YFP-markierten Mutanten in HEK293-Zellen einen Tag nach der Transfektion.

Lee und Mitarbeiter fanden 2002 die heterozygote Mutation MC3R I183N bei einer 13 Jahre alten Patientin und ihrem Vater. Beide Patienten wiesen Übergewicht auf. Die funktionelle Charakterisierung durch Rached und Mitarbeiter 2003 zeigte einen kompletten Funktionsverlust sowie einen dominant negativen Effekt hinsichtlich des Rezeptorwildtyps.

Die Mutation des GHSR A204E führt zu einer reduzierten Oberflächenexpression und dem Verlust der charakteristischen konstitutiven Aktivität des GHSR. Träger dieser Mutation wurden 2006 von Pantel und seinen Mitarbeitern in zwei separaten Familien gefunden. Die zweite

bekannte natürliche genetische Veränderung des GHSR F279L wurde von Wang et al. 2004 publiziert.

Die generierten Mutanten wurden zur Prüfung der Expression und Lokalisation als auch für anschließende FRET-Experimente C-terminal mit CFP oder YFP fusioniert. Für die beiden GHSR-Mutationen wurde sowohl eine Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum als auch in der Plasmamembrane der HEK293-Zellen beobachtet (Abb. 36). Die von Rached und Mitarbeitern (2004) beschriebene, intrazelluläre Akkumulation der MC3R-Mutante I183N konnte bestätigt werden.

Die für die Koexpression der MC3R Mutante I183N und des Rezeptor-Wildtyps ermittelte FRET-Effizienz von $17,15 \pm 2,6$ lag unwesentlich über dem Signal für das Wildtyp-Homodimer (Abb. 36A). Die Koexpression dieser Mutante mit GHSR führte im Vergleich zum GHSR/MC3R Heterodimer zu einer leichten Reduktion des FRET-Signals (GHSR+MC3R $16,1 \pm 0,7$, GHSR+MC3R I183N $13,9 \pm 1,4$; Abb. 36B).

Aufgrund der unterschiedlichen Verteilungsmuster der koexprimierten Rezeptoren (Abb. 37) ist zu vermuten, dass die ermittelte Dimerisierung sowohl mit dem MC3R-Wildtyp als auch mit dem GHSR hauptsächlich im endoplasmatischen Reticulum oder in intrazellulären Strukturen erfolgt.

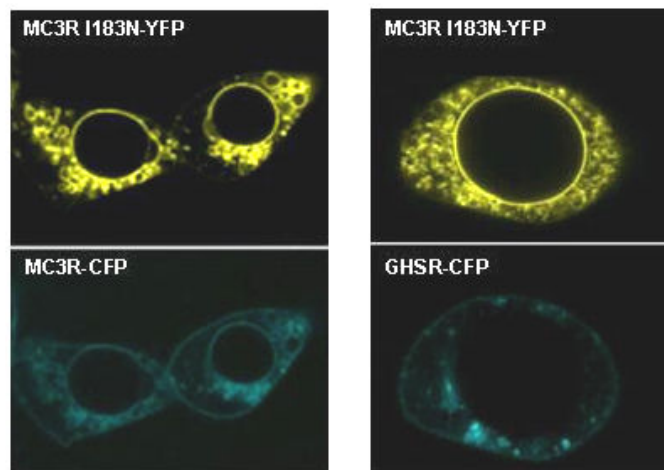


Abbildung 37: Subzelluläre Lokalisation nach der Koexpression von MC3R+MC3RI183N und GHSR+MC3RI183N in HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden mit der MC3R-Mutante I183N, welche C-terminal mit YFP fusioniert wurde, und dem CFP-markierten MC3R (Wildtyp) bzw. GHSR transient kotransfiziert. Die daraus resultierenden Proteinverteilungsmuster wurden mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie aufgezeichnet.

Die für die Kotransfektionsansätze GHSR A204E+MC3R und GHSR F279L+MC3R bestimmten FRET-Effizienzen lagen mit $13,9 \pm 0,9$ und $12,5 \pm 1,9$ leicht unter dem Wildtyp-Heterodimer

(Abb. 36D). Auch die Formation der entsprechenden Homodimere (GHSR+GHSR A204E bzw. GHSR+GHSR F279L) wurde durch die Mutationen nicht signifikant beeinträchtigt (Abb. 36C).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass keine der für die FRET-Bestimmung ausgewählten Mutationen einen Effekt auf die Homo- oder Heterodimerisierung der Wildtyp-Rezeptoren GHSR und MC3R hat.

Für die funktionelle Charakterisierung der Mutanten in den unterschiedlichen Koexpressionen mit dem MC3R- oder GHSR-Wildtyp-Rezeptor wurden die C-terminal fusionierten Fluorophore modifiziert und durch ein kleineres Epitop (Flag-Tag) ersetzt. Die transient kotransfizierten COS-7-Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion mit steigenden Konzentrationen des Agonisten α -MSH stimuliert. Im Anschluß erfolgte die Bestimmung des angereicherten intrazellulären cAMP-Spiegels.

Für die Koexpression der Mutante MC3R I183N mit GHSR sowie mit rM3R und für die Kombinatoriken GHSR+rM3R konnte im Vergleich zum Basalwert kein Anstieg der ligandenvermittelte cAMP-Produktion bestimmt werden (Abb. 38). Diese Daten korrelieren mit den publizierten Zellkulturexperimenten von Tao und Segaloff (2004) und lassen sich mit der intrazellulären Lokalisation der MC3R-Mutante I183N erklären (Abb.36; Rached et al., 2004). Die Koexpression der beiden Mutanten des GHSR mit MC3R bewirkte in beiden Fällen eine Reduktion der maximalen konzentrationsabhängigen cAMP-Antwort nach der Stimulation mit α -MSH im Vergleich zum Heterodimer der beiden Wildtyp-Rezeptoren. Mit Hilfe von *in vitro* Experimenten konnte mehrfach gezeigt werden, dass die Mutationen A204E und F279L einen Verlust bzw. eine Reduktion der für den GHSR charakteristische Liganden-unabhängigen Signaltransduktion bewirken (Holst et al., 2003 und Liu et al., 2007). Daher lag die Vermutung nahe, dass die für die Koexpression GHSR/MC3R gemessene signifikante Erhöhung des cAMP-Spiegels nach der Stimulation des MC3R mit den Agonisten α -, β - und γ -MSH auf die hohe Basalaktivität des GHSR (Holst & Schwartz, 2004) zurückgeführt werden konnte.

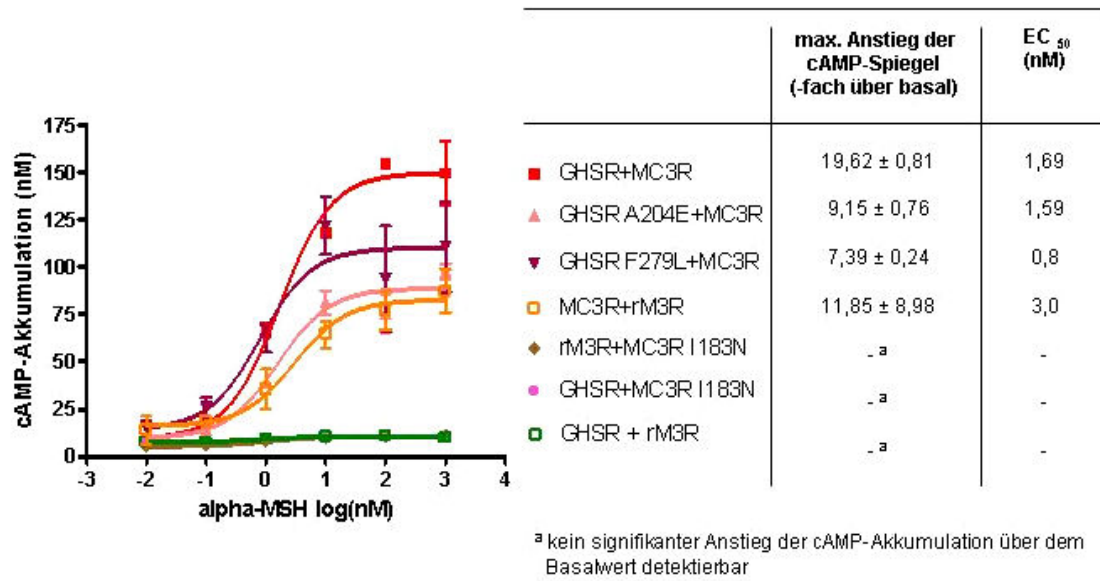


Abbildung 38: Funktionelle Charakterisierung der Mutanten MC3R I183N, GHSR A204E und GHSR F279L

Die cAMP-Akkumulationsassays wurden an COS-7-Zellen durchgeführt, die mit MC3R und GHSR A204E (*rosa*) oder F279L (*violett*) sowie MC3R I183N und rM3R (*braun*) oder GHSR (*pink*) transient kotransfiziert wurden. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen α -MSH inkubiert und nach 30 Minuten der jeweils induzierte cAMP-Spiegel bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Experimenten, welche in Triplikaten durchgeführt wurden. Zum Vergleich wurden zusätzlich die Konzentrations-Wirkungskurve für das MC3R Homodimer (MC3R+rM3R, *orange*), GHSR/MC3R Heterodimer (*rot*) und als negativ Kontrolle die Werte der Koexpression GHSR und rM3R (*grün*) dargestellt.

4 Diskussion

Neben der kurzzeitigen Steuerung der täglichen Nahrungsaufnahme durch die Entstehung von Hunger und Sättigungsgefühlen, gewährleistet die hypothalamische Appetitregulation ein langfristig stabiles Gleichgewicht zwischen der Energieaufnahme und dem Energieumsatz des Körpers (Energiehomöostase). Die zentrale Vermittlung hormoneller, peripherer Signale läuft über deren Bindung an membranständige Rezeptoren, zumeist GPCR. Da diese neben einem z.T. komplexen Signalisierungsverhalten durch die Kopplung an bis zu 4 G-Proteinfamilien und Transaktivierungen mit Rezeptortyrosinkinasen sowohl Homo- als auch Heterodimere, sowie Oligomere ausbilden können (Bouvier, 2001; George et al., 2002), entsteht ein weit aus umfangreicheres Signaltransduktions-Netzwerk als bis lang angenommen.

Zwei Vertreter der großen Familie der GPCRs sind die beiden Melanocortin-Rezeptoren 3 und 4 (MC3R und MC4R), die darüber hinaus wichtige Kontrollelemente innerhalb der hypothalamischen Appetitregulation darstellen. Der vorrangig im PVN exprimierte MC4R vermittelt den anorexigenen (Appetit-hemmenden) Effekt des peripheren Homones Leptin, welches proportional zum Körpergewicht von den Adipocyten (Fettzellen) freigesetzt wird. Der MC3R wird ebenfalls von anorexigenen Neuropeptiden (α -, β - und γ -MSH) aktiviert, doch aufgrund seiner Expression im ARC auf den Neuronen des orexigenen (Appetit-stimulierenden) Systems ist seine Funktion in der hypothalamischen Appetitregulation bisher nicht vollständig geklärt. Man vermutet jedoch eine Rolle als sogenannter Autorezeptor im ARC (Cowley et al., 2004).

Daher lag der Fokus dieser Arbeit auf der Untersuchung der Dimersierungseigenschaften von unterschiedlichen in die hypothalamische Appetitregulation involvierten GPCRs mit MC3R oder MC4R. Um die Interaktion von GPCRs zu untersuchen gibt es 2 prinzipiell unterschiedliche Methoden: den Nachweis über differentiell N- bzw. C-terminal Epitop-markierte Rezeptoren (Immunioprecipitation und Western-Blot oder ELISA) oder nur über spezifische C-terminale Markierungen für biophysikalische Methoden (BRET und FRET).

4.1 Homo- und Heterodimerisierung von hypothalamischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Um die Assemblierung von GPCRs zu bestimmen wurde bereits der Sandwich-ELISA erfolgreich in unserer Arbeitsgruppe eingesetzt, zusätzlich wurde nun FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer) als eines von zwei bekannten RET (Resonanz-Energietransfer)-Verfahren

ausgewählt und zunächst etabliert (Abb. 39). Der Einsatz von FRET ermöglicht eine Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen heterologer Expressionssysteme. Eine von Pfleger und Eidne (2005) aufgestellte Zusammenfassung der im Laufe der letzten Jahre, mit Hilfe des RET-Prinzips durchgeführten GPCR-Interaktionsstudien, macht die steigende Popularität dieser Technik deutlich. Bis Anfang des letzten Jahres wurden mehr als 100 Arbeiten veröffentlicht, die BRET zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen nutzten (Bouvier et al., 2007). Die Methode ist allerdings nicht unumstritten. Die Schwierigkeit liegt nicht nur im Nachweis von di- oder oligomeren Strukturen, sondern in der Differenzierung von „echten“ Interaktionen und Artefakten (James et al., 2006; Lohse, 2006). Die Verwendung von fluoreszierenden Epitopen ermöglichte aber zudem auch die Darstellung der subzellulären Lokalisation der Interaktion kotransfizierter Rezeptor-Fusionsproteine (Kokalisation).

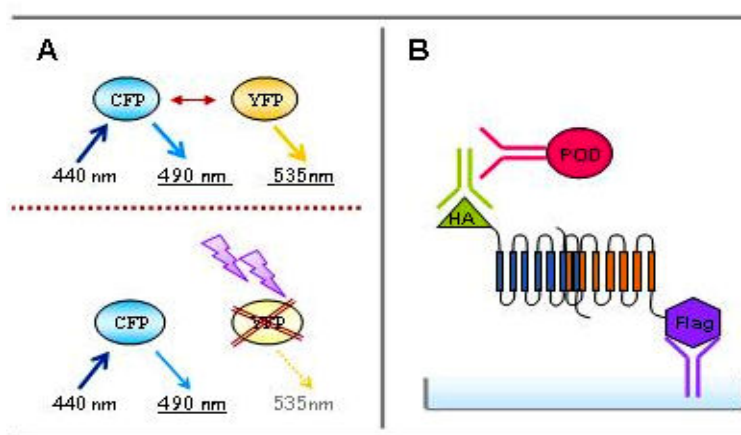


Abbildung 39: Illustration der Methoden, die für die Interaktionsstudien herangezogen wurden.

A: FRET Zwischen CFP (Donor) und YFP (Akzeptor) findet ein Energietransfer statt, wenn der Abstand zwischen den beiden Fluorophoren weniger als 10 nm beträgt. Durch das Ausbleichen des Akzeptors wird der FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer) unterbunden und es kommt zum Anstieg der Donor-Fluoreszenz. **B: Sandwich-ELISA** Nachweis eines Rezeptor-Dimers über zwei unterschiedliche Markierungen am C-Terminus bzw. am N-Terminus von jeweils einem der beiden koexprimierten GPCRs.

In der vorliegenden Arbeit wurde FRET für MC4R und MC3R durchgeführt und wie erwartet konnte eine hohe FRET-Effizienz für die homodimere Kombinationen von MC3R und MC4R gemessen werden (Ergebnisse 3.1.3). Im Fall des MC4R wurden somit die Daten von Biebermann und Mitarbeitern (2003) sowie Nickolls und Mitarbeitern (2006) bestätigt. Bei der Koexpression unterschiedlicher GPCRs ergaben nur die heteromeren Kombinationen mit GHSR und MC3R sowie GPR7 und MC4R FRET-Signale, die mit den Signalen der entsprechenden Homodimere vergleichbar waren. Damit konnte zum ersten Mal die Interaktion von MC3R bzw. MC4R mit

einem anderen in die hypothalamische Appetitregulation involvierte GPCR gezeigt werden. Bisher wurde nur eine Interaktion von MC3R mit einem eng verwandten Rezeptor, dem MC1R, beschrieben (Mandrika et al., 2004). Darüber hinaus gelang es die Interaktion der einzelnen Rezeptorpaare noch durch den immunologischen Nachweis des jeweiligen Heterodimers zu bestätigen (Sandwich ELISA, 3.1.4). Somit wurde auch ausgeschlossen, dass es sich bei den durch FRET-Daten ermittelten Interaktion um ein Artefakt handelt. Die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von solchen zufälligen Rezeptorkomplexen in der Zellmembran ist bedingt durch die Verwendung eines heterologen Überexpressionssystems relativ hoch und kann zu falsch-positive Ergebnisse führen (Eidne et al., 2002; James et al., 2006). Durch die transiente Transfektion von Zellen wird eine deutlich höhere Proteinexpression erzielt als bei stabilen Zelllinien. Allerdings weisen die Zellen in diesen Kulturen unterschiedliche Expressionslevel hinsichtlich der transfizierten Rezeptoren auf, was ebenfalls zu einer Verfälschung der FRET-Signale führen kann (Ayoub et al., 2002; Terrillon et al., 2003). Dieses Problem macht die Notwendigkeit einer guten Negativkontrolle deutlich, die unter den gleichen Bedingungen ungeachtet der Expressionsprofile keine FRET-Signale liefert (Pfleger & Eidne, 2005). Da aufgrund der niedrigen FRET-Effizienz der Koexpression von MC4R mit dem phylogenetisch eng verwandten CB1R eine Dimersierung ausgeschlossen werden konnte, wurde dieser GPCR als Negativkontrolle für die Interaktionsstudien herangezogen.

Dass eng verwandte GPCRs nicht zwangsläufig miteinander dimersieren zeigten u.a. Interaktionsstudien innerhalb der Mitglieder der Familie der Opioid-Rezeptoren (George et al., 2000; Jordan et al., 1999). Der CB1R gehört zu den am häufigsten exprimierten GPCRs im Zentralnervensystem. Er ist vor allem im Hypothalamus (im PVN und im VMN) lokalisiert und an der Appetit- und Gewichtsregulation beteiligt (Pagotto et al., 2006a+b). Für den CB1R sind u.a. Heterodimersierungen mit dem Dopamin-D2-Rezeptor und dem μ -OPR beschrieben worden (Kearn et al., 2005; Rios et al., 2006). Das von zwei Arbeitsgruppen in Gehirnpräparationen nachgewiesene CB1R Homodimer konnte im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* nicht bestätigt werden (Wager-Miller et al., 2002; De Jesús et al., 2006). Möglicherweise sind spezifische assessorische Faktoren an der Rezeptordimerisierung beteiligt, die in den hier eingesetzten Säugerzelllinien nicht vorkommen. So vermitteln beispielsweise so genannte GPCR-interagierende Proteine (GIPs) die Aggregation von GPCRs zu großen Rezeptosomen (Bockaert et al., 2004). Für die Oberflächenexpression des MC2R ist das assessorische Protein MRAP, welches eine Transmembrandomäne besitzt, essentiell (Cooray et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass RAMPs (receptor activity modifying proteins) u.a. den Transport sowie die Ligandenspezifität des Calcitonin- und des Calcitonin-ähnlichen Rezeptor bedingen (Hay et al., 2006). Die konstitutive

Aktivität des CB1R wird durch die C-terminale Bindung von CRIB1a (cannabinoid receptor interacting protein 1a) inhibiert (Niehaus et al., 2007). Das legt die Vermutung nahe, dass es zur Ausbildung von funktionellen oligomeren Strukturen kommt, die allerdings zurzeit nicht mit FRET nachweisbar sind. Um die Ausbildung von oligomeren Strukturen nachweisen zu können, sollten die über Immunopräzipitationen isolierte Di- bzw. Oligomere in SDS-Gelen aufgetrennt und anschließend mit Hilfe von Westernblot-Analysen klassifiziert werden. Aufgrund von schlechten Antikörpern gelang bisher nur einer Arbeitsgruppe der immunologische Nachweis des CB1R-Dimers (De Jesús et al., 2006, Grimsey et al., 2008).

Die niedrigen FRET-Signale, die für die Kombinatoriken NPY2R+MC3R und μ -OPR+MC3R sowie 5-HTR_{1B} bestimmt wurden, ließen zunächst vermuten, dass hier keine direkte Interaktion zwischen den GPCRs vorlag. Alle drei Werte lagen nur knapp über der fest gesetzten empirischen Grenze von 8 % für eine intakte Dimersierung. Im Sandwich ELISA gelang es jedoch diese Heterodimere zu detektieren, wobei die Werte für die Koexpression von NPY2R bzw. μ -OPR mit MC3R vergleichbar waren mit denen des GHSR/MC3R-Heterodimers. Möglicherweise waren die sterischen bzw. räumlichen Bedingungen zwischen den Fluorochromen für die Ausbildung von FRET nicht optimal. Eine Verbesserung der FRET-Effizienz könnte in diesem Fall durch den Austausch der relativ großen Fluoreszenzmarkierungen gegen kleinere Tags erzielt werden. Hoffman und Mitarbeiter (2005) nutzten erstmals FAsH, ein kleines Molekül, das erst durch die Bindung an das Aminosäuremotiv CCPGCC fluoresziert, in Kombination mit CFP zum Nachweis von Konformationsänderungen innerhalb eines Proteins mittels FRET. Auch die Verlegung der Fluoreszenzmarkierungen, beispielsweise vom C-Terminus zum N-Terminus könnte in Betracht gezogen werden (Eidne et al., 2002). Da im Sandwich ELISA weniger 5-HTR_{1B}/MC4R-Dimere im Vergleich zum GPR7/MC4R Heterodimer nachgewiesen werden konnten, ist hier eine verminderte Interaktionsfähigkeit zu vermuten. Die in beide Methoden beobachtete schwache Affinität wirft zu dem die Frage nach möglichen gewebespezifischen Chaperonen oder assessorischen Proteinen auf, die nicht nur für die korrekte Proteinfaltung und Membranlokalisation notwendig sind, sondern darüber hinaus die Interaktion mit anderen GPCRs unterstützen. Es wurden zwar zwei unterschiedliche Säugerzelllinien benutzt (HEK293- und COS-7-Zellen), die jedoch den gleichen Ursprung (Niere) haben und somit mehr oder weniger vergleichbare Proteinmuster aufweisen. Die Wahl eines anderen Zellsystems (z.B. eine hypothalamische Zelllinie) würde möglicherweise zu einer Veränderung der einzelnen Rezeptorkonformationen führen, was wiederum einen Einfluß auf die Interaktion und somit auf die FRET-Effizienz haben könnte. Allerdings ist zu bedenken, dass sich einige Säugerzelllinien nur schwer transfizieren lassen. Eine Modifikation der Rezeptorkonformation wird auch durch die

Bindung eines Liganden herbeigeführt. Es wäre vorstellbar, dass die Dimersierung von GPCRs erst in Gegenwart von einem Liganden erfolgt oder durch die Bindung erst vollständig ausgebildet wird. Dies konnte beispielsweise für die Heterodimersierung des Dopamin-1-Rezeptors mit dem GHSR beobachtet werden (Jiang et al., 2006). Im Rahmen der hier durchgeführten Interaktionsstudien wurde nur die konstitutive Dimerisierung von GPCRs untersucht. Es sollte jedoch bedacht werden, dass anhand von FRET- oder BRET-Daten (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) nicht geschlussfolgert werden kann, ob eine Veränderung des detektierten Signals entweder auf eine verstärkte Interaktion zwischen den beiden Rezeptoren oder auf eine Konformationsänderung innerhalb der interagierenden Rezeptoren (möglicherweise bedingt durch die Interaktion) zurück geführt werden kann (Kristiansen et al., 2004).

Die Spezifität einer GPCR-GPCR-Interaktion kann darüber hinaus mit Hilfe von Kompetitions-Assays demonstriert werden (Pfleger & Eidner, 2005). Ein möglicher Ansatz ist die Koexpression von zwei markierten GPCRs (Donor mit CFP-Tag und Akzeptor mit YFP-Tag) in Gegenwart oder Abwesenheit eines unmarkierten Rezeptormoleküls, das mit einem der beiden markierten GPCR interagiert (z.B. in Form einer Homodimersierung). Mit steigender Konzentration des unmarkierten Rezeptors ist eine proportionale Reduktion der FRET-Effizienz des untersuchten Heterodimers zu beobachten, da es zur Verdrängung von einem der markierten GPCRs durch den unmarkierten Rezeptor kommt (Ayoub et al., 2002; Devost & Zingg, 2004). Beruht die beobachtete Dimersierung auf einer unspezifischen Interaktion, so bleibt die FRET-Effizienz im Wesentlichen gleich. Zur weiterführenden Charakterisierung des GHSR/MC3R als auch des GPR7/MC4R Heterodimers wurde bereits im Rahmen dieser Arbeit mit dem Aufbau eines solchen Kompetitions-Assays begonnen. Es empfiehlt sich auch die anderen hier vor gestellten Kombinatoriken mit Hilfe des oben beschriebenen Ansatzes nochmals zu überprüfen.

4.1.1 Subzelluläre Lokalisation der heterolog exprimierten GPCRs

Die Lokalisation der heterolog exprimierten GPCRs wurde mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie optisch überprüft (Material & Methoden 2.5.1 und Ergebnisse 3.1.1). Darüber hinaus erfolgte anhand von Oberflächen-ELISAs ein Nachweis der spezifische Oberflächenexpression der einzelnen Rezeptoren über eine am N-Terminus angebrachten Tag (Material & Methoden 2.7.1 und Ergebnisse 3.1.1.1). Mit Ausnahme des GPR7, konnte für alle im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit untersuchten GPCRs eine membranständige Lokalisation in HEK293- und in COS-7-Zellen gezeigt werden.

Die Koexpression mit MC4R bewirkte im Fall von GPR7 eine Veränderung des Proteinverteilungsmusters. Das Heterodimer zeigte eine deutliche Lokalisation im ER und in der Plasmamembran, wohin gegen GPR7 allein hauptsächlich intrazellulär vorlag (3.1.1, Abb. 17 und 3.1.2 Abb. 19). Für viele Proteine ist die Formation von oligomeren Strukturen ein notwendiger Schritt bei der Proteinfaltung- und -modifizierung im endoplasmatischen Retikulum, da so Carboxyl-terminale Retentionssequenzen oder hydrophobe Aminosäuremotive maskiert werden können (Reddy und Corley, 1998)(Abb. 40). Das neben Chaperonen oder Chaperon-ähnlichen

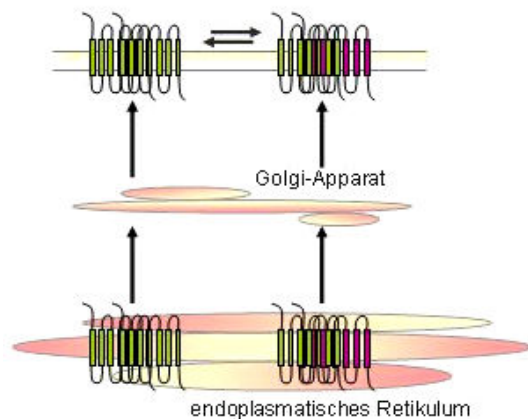


Abbildung 40: Subzelluläre Lokalisation von koexprimierten, fluoreszierenden Rezeptor-Fusionsproteinen.

Die Biosynthese von Membranproteinen, wie den GPCRs, erfolgt im rauen endoplasmatischen Retikulum (ER). Chaperone vermitteln die korrekte Faltung der Rezeptorproteine, welche über ihre hydrophoben Domänen in die Membran des ER eingebaut und zu Transportvesikeln abgeschnürt werden. Über den Golgi-Apparat erfolgt der Transport zur und der Einbau in die Plasmamembran. Die Dimerisierung von GPCRs findet in einer frühen Phase der Proteinbiosynthese statt und stellt einen wichtigen Schritt der Proteinfaltung dar. Darüber hinaus beeinflusst die Interaktion von GPCRs den Transport der Rezeptormoleküle an die Zelloberfläche.

Proteinen auch die Dimersierung von GPCR essentiell für einen optimalen Transport zur Plasmamembran ist, konnte eindeutig anhand des GABA_{B1/B2}-Heterodimers (Marshall et al., 1999; Margeta-Mitrovic et al, 2000) gezeigt werden. Da die Interaktion von GPCRs in einer frühen Phase der Proteinbiosynthese im ER stattfindet, kann der Transport und die Oberflächenexpression eines Rezeptormoleküls durch die Dimerisierung mit einem anderen Rezeptor deutlich verbessert oder überhaupt erst ermöglicht werden. Um eine eindeutige Aussage bezüglich der mittels Laser-Scanning-Mikroskopie beobachteten Erhöhung der Oberflächenexpression des GPR7 nach der Koexpression mit MC4R treffen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit damit begonnen, die spezifische Oberflächenexpression anhand eines N-terminalen HA-Tag zu bestimmen (Oberflächen-ELISA). Sollte sich die Vermutung bestätigen, dann stellt sich die Frage, ob die Heterodimersierung von GPR7 und MC4R möglicherweise eine Regulation der Aktivität des GPR7 darstellt, da die Anzahl von funktionellen Rezeptormolekülen

an der Zelloberfläche so erhöht werden könnte. Bislang konnten dies aber noch nicht bestätigen werden.

4.1.2 Mechanismen der Dimerisierung von GPCRs

Die Dimerisierung ist inzwischen ein akzeptiertes Konzept der Funktionsweise von GPCR (Bouvier, 2001; George et al., 2002; Jacoby et al., 2006; Terrillon et al., 2004). Welche molekularen Mechanismen sich dahinter verbergen ist bisher noch weitestgehend unbekannt und nur für einzelne Beispiele ansatzweise aufgeklärt. Es wird jedoch von zwei grundlegenden Mechanismen der Interaktion ausgegangen: Disulfidbrückenbildung zwischen zwei Cystein-Resten oder Interaktion von Transmembrandomänen.

4.1.2.1 Disulfidbrücken können an der Ausbildung von Rezeptordimeren beteiligt sein

Die für den Calcium ($[Ca^{2+}]_o$)-sensing Rezeptor (CaR) nachgewiesene Dimerstruktur konnte auf die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen Cystein-Resten der extrazellulären Domänen der beiden Rezeptormoleküle zurückgeführt werden (Bai et al., 1998; Zhang et al., 2001). Diese kovalente Interaktion trägt zudem zur Stabilisierung bei und unterstützt den Übergang des Rezeptors vom inaktiven in den aktiven Zustand (Pace et al., 1999). Ein Cystein-Rest in der Transmembrandomäne 4 des D2R (Dopamin-Rezeptor 2) ist vermutlich an der Homodimerisierung des Rezeptors beteiligt (Guo et al., 2003). Dass Disulfidbrücken eine wichtige Rolle bei der Dimerisierung von GPCRs spielen, konnte unter anderem auch für den Vasopressin-2-Rezeptor und den M3-muskarinergen Acetalcholin-Rezeptor gezeigt werden. Für diese Rezeptoren wurde eine Dissoziation unter reduzierenden Bedingungen beobachtet (Schulz et al., 2000; Zeng & Wess, 2000).

Daher wurde für verschiedene Homo- als auch Heterodimere die FRET-Effizienz unter reduzierenden Bedingungen ermittelt. HEK293-Zellen wurden mit CFP- oder YFP-fusionierten Rezeptoren transient kotransfiziert. Vor der Bestimmung der Intensitätszunahme des Donorfluorochroms (CFP) während des Ausbleichens des Akzeptors (YFP-Fluorophor) wurden die Zellen für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 10 mM DTT inkubiert (Material & Methoden 2.5.2.1). Um es übersichtlicher zu machen werden zunächst die Ergebnisse für die untersuchten Homodimere (MC3R, MC4R und GHSR) und anschließend die der beiden Heterodimere (GHSR+MC3R, GHSR+MC4R) besprochen.

(A) Die Rolle von Disulfidbrücken bei der Homodimersierung von GPCRs

MC3R und MC4R gehören beide der Familie der Melanocortin-Rezeptoren an und zeigen somit auch eine große Sequenzhomologie von 60 % (Kim et al., 2002; siehe Abb. 41). Die Verteilung der einzelnen Cystein-Reste innerhalb der Aminosäuresequenz der beiden Rezeptoren ist in der Abbildung 41 markiert.

Die Inkubation mit DTT bewirkte im Fall des MC4R-Homodimers keine Veränderung des FRET-Signals, was vermuten lässt, dass diese Interaktion nicht auf der Ausbildung von Disulfidbrücken basiert. Dies entspricht den Ergebnisse von Elsner und Mitarbeitern (2006), die nachwiesen, dass Cystein-Quervernetzungen in der extrazellulären Schleife 3 keine funktionelle Rolle bei der Interaktion spielen. Die geringe Anzahl erreichbarer Cystein-Reste innerhalb der Aminosäuresequenz der Transmembrandomänen des MC4R, die mit Hilfe einer computergestützten Modellierung anhand des β_2 adrenergen Rezeptor ermittelt wurden (Tabelle 9), unterstützen die Vermutung, dass Disulfidbrücken bei Interaktionen des MC4R eine untergeordnete Rolle spielen.

MC3R	MSIQKTYLEGDFVFPVSSSSFLRTLLEPQLGSALLTAMNASCCLPSPVQPTLPNGSEHLQA
MC4R	-----MVNSTHRCMHTSLHLWNRSSYRLHSNASESLG-----
	: **: **: *: *: *: *: *
	TM1
MC3R	PFFSNQSSSAFCEQVF IKPEVFLSLGIVSLLENILVILAVVRNGNLHSPMYFFLCSLAVA
MC4R	---KGYSDDGGCYEQLFVSPEVFTLGVISLLENILVIVAI AKNKNLHSPMYFFICSLAVA
	.. *... **: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *
	TM2 TM3
MC3R	DMLVSVSNALETIMIAIVHSDYLTFFDQFIQHMDNIFDSMICISLVASICNLLAIAVDRY
MC4R	DMLVSVSNGSETIVITLLN-STD TDAQSFTVNIDNVIDSVICSSLLASICSLLSIAVDRY
	*****. *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *
	TM4 TM5
MC3R	VTIFYALRYHSIMTVRKALTLIVAIWVCCGVCGVVFIVYSESKMVIVCLITMFFAMMLLM
MC4R	FTIFYALQYHNIMTVKRVGIIISCIWAACTVSGILFIIYSDSSAVIICLITMFFTMLALM
	.*****: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *
	TM6
MC3R	GTLVYVHMFLEFARLHVKRIAAALPPADGVAPQQHSCKMGAVTITILGVVFIFCWAPFFLHLV
MC4R	ASLVYVHMFLEFARLHIKRIAVLPGTG--AIRQGANMKGAITLTILIGVFVVCWAPFFLHLI
	.:*****: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *
	TM7
MC3R	LIIITCPNTPYCICTAHFNTYLVLMCNSVIDPLIYAFRSLELRNTFREILCGCNGMNLG
MC4R	FYISCPQNPYCVCFMSHFNLYLILIMCNSIIDPLIYALRSQELRRTFKEIICCYPLGGLC
	: *: * *: * *: * *: * *: * *: * *: * *: * *: * *: * *: *
MC3R	-----
MC4R	DLSSRY

Abbildung 41: Alignment der Aminosäuresequenz von MC3R und MC4R (Clustal W)

Gelb-markiert sind Transmembrandomänen (TM) der beiden Rezeptoren. Cystein-Reste sind farblich hervorgehoben (rot).

Tabelle 9: Orientierung von Cysteinen der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren MC3R, MC4R und GHSR

	MC3R	MC4R	GHSR
N-Terminus	C35	C40	
TM 1			C50, nicht erreichbar
TM 2	<i>C78, erreichbar</i>	C84	<i>C95, erreichbar</i>
TM 3	C125, innen C133, nicht erreichbar	C130 C138	C116, nicht erreichbar (Disulfid-Brücke, ecl 2) <i>C126, erreichbar</i> <i>C146, erreichbar</i>
TM 4	<i>C171, erreichbar</i> C172, nicht erreichbar <i>C175, erreichbar</i>	<i>C172, erreichbar</i> C177	C173
ecl 2			C198 (Disulfid-Brücke, TM 3)
TM 5	<i>C191, erreichbar</i>	C196	<i>C227, erreichbar</i>
TM 6	C237, nicht erreichbar <i>C254, erreichbar</i>	C257	C275
ecl 3	C268 C274 C276	C271 C277 C279	
TM 7	<i>C290, erreichbar</i>	C293	<i>C304, erreichbar</i>

Anhand einer computergestützten Modellierung der räumlichen Struktur der Aminosäuresequenzen von MC3R, MC4R und GHSR wurden versucht die für die Ausbildung möglicher Disulfid-Brücken zur Verfügung stehenden Cysteine zu ermitteln. Cystein-Reste, die aufgrund ihrer räumlichen Orientierung erreichbar sind, wurden kursiv hervorgehoben. Für einige Cysteine konnte keine eindeutige Aussage getroffen werden (*grau*). Diese Analyse wurde von Gunnar Kleinau am Leibnitz Institut für Molekulare Pharmakologie durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

TM: Transmembrandomäne, ecl: extrazelluläre Schleife

Im Gegensatz dazu deutet die Reduktion des FRET-Signals des MC3R-Homodimers unter reduzierenden Bedingungen auf die Dissoziation des Dimers hin. Dass Interaktionen des MC3R u.a. durch die Ausbildung von Disulfidbrücken unterstützt werden, lässt die, im Unterschied zum MC4R, große Anzahl (mindestens 6) an verfügbaren Cystein-Resten vermuten. Es sollte dabei jedoch bedacht werden, dass anhand von FRET- Daten nicht geschlussfolgert werden kann, ob eine Veränderung des detektierten Signals entweder auf eine verstärkte oder reduzierte Interaktion

zwischen den beiden Rezeptoren oder auf eine Konformationsänderung innerhalb der interagierenden Rezeptoren zurück geführt werden kann (Kristiansen et al., 2004). Daher könnte die hier beobachtete Abnahme der FRET-Effizienz auch mit der Auflösung intramolekularer Disulfidbrücken und einer damit verbundene Konformationsänderungen erklärt werden, die letztendlich eine veränderte Ausrichtung der beiden Fluorophore zueinander bewirkt. Dass bei eng verwandten Rezeptoren unterschiedliche Mechanismen der Interaktion eine Rolle spielen, konnte anhand von 3D-Modellen der Opioid-Rezeptoren (δ -, κ - und μ -OPR) verdeutlicht werden, die verschiedene Dimerisierungsdomänen für die einzelnen Rezeptoren aufzeigten (Filizola et al., 2002).

(B) Die Rolle von Disulfidbrücken bei der Heterodimersierung von GPCRs

Um die postulierte Divergenz in den Interaktionsmechanismen des MC3R und des MC4R näher zu analysieren, wurden Koexpressionsansätze der beiden Rezeptoren mit dem GHSR mittels FRET untersucht. Die Expression des GHSR konnte nicht nur im Nucleus arcuatus sondern auch in andere Regionen des Hypothalamus, wie beispielsweise für den Nucleus paraventricularis, nachgewiesen werden (Howard et al., 1996; Gua et al., 1997). Daher ist neben der in dieser Arbeit vorgestellten, Heterodimersierung des GHSR mit dem im ARC exprimierten MC3R auch eine Interaktion mit dem im PVN exprimierten MC4R nicht auszuschliessen. Die relativ niedrige FRET-Effizienz des Koexpressionsansatzes GHSR+MC4R deutet auf eine begrenzte Interaktionsfähigkeit zwischen den beiden Rezeptoren hin. Da unter reduzierenden Bedingungen ein Anstieg des FRET-Signals bestimmt werden konnte, führte die Aufhebung von intra- oder intermolekularen Disulfidbrücken zu einer Konformationsänderung, die zu einer Annäherung der beiden Fluorophore führte. Die Interaktion zwischen GHSR und MC4R erfolgt im Unterschied zur Assemblierung der beiden Rezeptormoleküle des MC4R-Homodimers mit einer deutlich geringeren Effizienz. Bei beiden Interaktionen sind Cystein-Quervernetzungen scheinbar nicht notwendig, sie bedingen möglicherweise eher Rezeptorkonformationen, die eine sterische Annäherung hemmen.

Die hohen FRET-Effizienzen, die sowohl für das MC3R-Homodimer als auch für das GHSR/MC3R-Heterodimer ermittelt wurden lassen vermuten, dass beiden Interaktionen eine vergleichbare Affinität zwischen den Rezeptormolekülen zu Grunde liegt. Bei einer Kotransfektion von verschiedenen Rezeptoren liegt immer ein Gemisch von Homo- und Heterodimeren vor (Ergebnisse 3.2, Abb. 24). Aufgrund der FRET-Werte ist anzunehmen, dass der Kotransfektionsansatz GHSR+MC3R das MC3R-Homodimer und das GHSR/MC3R-

Heterodimer zu gleichen Teilen aufweist, wohingegen beim Ansatz mit GHSR und MC4R das MC4R-Homodimer überwiegt. Der Anteil des GHSR-Homodimers ist in beiden Koexpressionsansätzen aufgrund der niedrigen FRET-Effizienz eher gering einzustufen (siehe Ergebnisse 3.1.5.1). Trotzdem konnten die Ergebnisse zur Homodimerisierung des GHSR von Jiang und Mitarbeitern (2006) sowie von Leung und Mitarbeitern (2007) bestätigt werden. Beide Arbeitsgruppen verwendeten u.a. die BRET-Technik (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) zum Nachweis von Interaktionen des GHSR in HEK293-Zellen. Obwohl mit Hilfe einer computergestützten Modellierung des GHSR mindestens 6 Cystein-Reste vorhergesagt werden konnten (Diskussion 4.1.2.1, Tabelle 9), die möglicherweise für die Ausbildung von Disulfidbrücken genutzt werden könnten, führte die Inkubation des GHSR-Homodimers mit DTT nicht zu einer Veränderung des FRET-Signals. Da unter reduzierenden Bedingungen für die Koexpression des GHSR mit dem MC3R eine Reduktion der FRET-Effizienz ermittelt wurde, scheinen Cystein-Quervernetzungen für die Interaktionen des GHSR mit anderen GPCR von größerer Bedeutung sein als bei der Formation des Homodimers. Eine solche Diversifikation konnte auch beim 5-HT₄-Rezeptor beobachtet werden, hier wurden vier Cystein-Reste bestimmt, die lediglich für die Formation homomerer Strukturen essentiell sind (Berthouze et al., 2007). Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit zum MC1R wies durch Mutagenese von verschiedenen Cysteinen zu Alanin die Ausbildung von vier Disulfidbrücken nach, die zwischen den Rezeptormolekülen bei der Dimerisierung dieses GPCR der Familie der Melanocortin Rezeptoren ausgebildet werden (Zanna et al., 2008). Die vierfache Mutante aller extrazellulären Cysteine Cys35-267-273-275Ala lieferte in SDS-PAGE-Analysen in Abwesenheit von reduzierenden Detergenzien lediglich eine Bande, die der monomeren Struktur des Proteins entsprach. Trotzdem konnte eine Dimersierung mit dem Wildtyp-Rezeptor ermittelt werden. Vermutlich kommen bei der Ausbildung von solchen oligomeren Strukturen nicht-kovalente Interaktionsmechanismen zutragen. Cys267, 273 und 275 liegen in der dritten extrazellulären Schleife (ecl3) des MC1R. Elsner und Mitarbeiter (2006) schlossen eine Beteiligung der Cystein-Reste in der ecl3 bei der MC4R Homodimerisierung dagegen aus. Abweichungen in den einzelnen Rezeptorkonformationen, die die spezifische Signalisierung eines jeden einzelnen Rezeptors trotz der großen Sequenzhomologie gewährleisten, bedingen möglicherweise auch unterschiedliche molekularen Mechanismen bei der Protein-Protein-Interaktion. Eine systematische Mutation der Cysteine des MC3R würde sich in Anbetracht der bisherigen Daten anbieten.

4.1.2.2 Interaktion von trunkierten MC4R-Konstrukte und dem Wildtyp-Rezeptor

Arbeiten zur Interaktion von GABA_{B1/B2}-Rezeptoren sowie zum α_1 -adrenergen Rezeptor machten erstmals deutlich, dass der effiziente Transport von GPCR an die Zelloberfläche u.a. auch von der Heterodimerisierung mit anderen GPCRs abhängig ist (Marshall et al., 1999; Uberti et al., 2004). Darüber hinaus legten mehrere Studien nahe, dass auch trunkierte GPCRs einen spezifischen Einfluss auf den Transport von den entsprechenden Wildtyp-Rezeptoren ausüben, was u.a. für den α_1 -adrenergen Rezeptor, den Dopamin-3-Rezeptor und seine Splicevariante D3nf (relevant bei Schizophrenie), den Gonadotropin-Rezeptor und den Vasopressin-2-Rezeptor gezeigt werden konnte (Cogé et al., 1999; Karpa et al., 2000; Elmhurst et al., 2000; Grosse et al., 1997; Zhu & Wess, 1998). Diese Daten gehen von einer Interaktion zwischen dem trunkierten Rezeptor und dem Wildtyp des Rezeptors aus und bilden die Grundlage für die Überlegung, anhand von trunkierten Konstrukten eines GPCR potentielle Dimerisierungsdomänen zu lokalisieren.

Zwei interagierende GPCRs können in ca. 49 unterschiedliche Konformationen nebeneinander in der Plasmamembran lokalisiert sein (Filizola et al., 2002). Zurzeit werden zwei grundlegende Modelle hinsichtlich der Dimerisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren diskutiert. Das Modell der Kontakt-Dimere postuliert die Interaktion der Transmembrandomänen unter Aufrechterhaltung der Transmembranstruktur der Rezeptormoleküle in der Membran. Im zweiten Modell, dem Modell des Domänen-übergreifenden Dimers, geht man vom Austausch einzelner Transmembrandomänen zwischen den Dimerisierungspartnern aus. Basierend auf computergestützten Studien zu den Dimerisierungsdomänen GPCRs wurden spezifische Regionen der Transmembrandomäne 4 bis 6 als potentielles Dimerisierungszentrum am häufigsten prognostiziert (Filizola & Weinstein, 2005). Mit Hilfe der FRET-Analyse wurde die Interaktion von trunkierten und CFP- oder YFP-fusionierten MC4R-Konstrukte (Ergebnisse 3.1.5.2, Abb. 23B) mit dem Wildtyp-Rezeptor MC4R in HEK293-Zellen bestimmt (siehe Material & Methoden 2.3.1.2 (b)). Im vorherigen Abschnitt (Disulfidbrücken 4.1.2.1) konnte gezeigt werden, dass Interaktionen dieses GPCR vermutlich nicht durch die Ausbildung von Disulfidbrücken erfolgen. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass hier die Interaktion der Transmembran-Helices von größerer Bedeutung ist. Da keine Splicevarianten für den MC4R bekannt sind, wurden zwei Konstrukte mit einer unterschiedlichen Anzahl an Transmembrandomänen generiert. Das Konstrukt MC4R TM3 umfasst die Transmembrandomänen 1 bis 3, wohingegen das Konstrukt MC4R TM5 die Transmembrandomänen 1 bis 5 beinhaltet. Beide wurden C-terminal mit einem intrazellulär lokalisierten Fluorochrom (CFP oder YFP) fusioniert. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl MC4R TM3 als auch MC4R TM5 mit dem MC4R Wildtyp-Rezeptor Heterodimere ausbildet (Ergebnisse 3.1.5.2, Abb. 23C). Die ermittelten FRET-Effizienzen waren vergleichbar

mit denen des ungekürzten MC4R-Homodimers. Leung und Mitarbeiter (2007) konnten ebenfalls eine Dimerisierung des GHSR mit dessen Splicevariante GHSR1b, welche lediglich die Transmembrandomänen 1 bis 5 umfasst, zeigen. Darüber hinaus beobachteten sie einen dominant-negativen Effekt des trunkierten Rezeptors auf den Wildtyp-Rezeptor, der u.a. die Hemmung des Transportes des ungekürzten GHSR zur Zellmembran mit sich führt. Ursache dafür könnte die fehlende Maskierung eines NLS-Motives (nuclear localization signal) in der 8. Helix sein, die bei 17 der über 200 Mitglieder der Rhodopsin-ähnlichen Familie der GPCRs gefunden wurde (Lee et al., 2004; O'Dowd et al., 2007).

Dass C-terminale coiled-coil Interaktionen für die Dimerisierung des MC4R nicht von Bedeutung sind, wurde über ein trunkiertes Rezeptorkonstrukt, welches keine TM7 und keinen C-Terminus besaß, nachgewiesen (Zanna et al., 2008). Anhand von SDS-PAGE-Analysen konnte gezeigt werden, dass sowohl der Wildtyp- als auch der trunkierte Rezeptor in der Lage waren di- und oligomere Strukturen auszubilden. Die im Rahmen dieser Untersuchung gemessenen FRET-Effizienzen für die Koexpression von MC4R TM3 bzw. MC4R TM5 mit dem Wildtyp-Rezeptor MC4R schließen ebenfalls aus, dass C-terminale coiled-coil Strukturen für die Rezeptorinteraktion notwendig sind. Möglicherweise spielen sie eine untergeordnete Rolle bei der Homodimerisierung des MC4R.

Die intrazelluläre Lokalisation der trunkierten MC4R-Konstrukte (3.1.5.2, Abb. 23A) verweisen auf eine Interaktion des kotransfizierten Wildtyp-Rezeptors mit den trunkierten Rezeptormolekülen in einer frühen Phase der Proteinbiosynthese und bestätigt damit die Dimerisierung als einen wichtigen Schritt der Rezeptorreifung (Terrillon et al., 2004). Die von Ho und Mitarbeitern (1999) nachgewiesene Bedeutung der C-terminale Region des MC4R für dessen korrekte Oberflächenexpression wurde anhand der trunkierten Rezeptorkonstrukte bestätigt. Weiterführende Arbeiten werden zeigen, ob die Kotransfektion des ungekürzten MC4R mit den trunkierten MC4R-Konstrukten einen Einfluß auf die Oberflächenexpression des Rezeptor-Wildtyps hat.

In Neuronen (jedoch nicht in HEK293-Zellen) konnte eine konstitutive Internalisierung sowie die erneute Lokalisation des recycelten MC4R in der Plasmamembran in Abwesenheit vom Liganden beobachtet werden (Mohammad et al., 2007). Welche Rolle dabei die Dimerisierung mit trunkierten MC4R-Konstrukten oder anderen GPCRs spielt ist zurzeit noch völlig unklar. Ein Defekt dieses Recycling-Kreislaufes könnte jedoch mit dem Auftreten von krankhafter Adipositas einhergehen. Es sind mehrere Nonsense- sowie Laseraster-Mutationen des humanen MC4R bekannt, die einen trunkierten Rezeptor herbeiführen.

Für die Splicevariante GHSR1b konnte ein dominant-negativer Effekt gegenüber dem Wildtyp-Rezeptor bestimmt werden (Leung et al., 2006). Interessant ist daher die Frage nach einem möglichen dominant-negativen Effekt der C-terminal verkürzten MC4R-Konstrukte. Bisher sind zwei MC4R-Punktmutationen (D90N in der TM 2 und S136F in der TM 3) mit einem dominant-negativen Effekt auf die Funktionalität des MC4R-Wildtyp beschrieben (Biebermann et al., 2003; Tarnow et al., 2008). Allerdings wurde für beide Mutationen keine Reduktion der Oberflächenexpression, wie sie für die trunkierten Rezeptorkonstrukte beschrieben wurde, in Folge der Heterodimerisierung mit dem MC4R beobachtet.

Mit der schrittweisen Verkürzung des MC4R in den einzelnen Kombinatoriken kommt es auch zur Reduktion der FRET-Effizienz. Eine äußerst begrenzte Interaktionsfähigkeit wurde für MC4R TM3 mit sich selbst beobachtet (3.1.5.2; Abb. 23C), die ermittelte FRET-Effizienz war vergleichbar mit dem Wert der Negativkontrolle (Koexpression CB1R+MC4R). Wohingegen der homodimere Transfektionsansatz des MC4R TM5 deutlich erhöhte FRET-Signale zeigte. Diese Daten korrelieren mit den computergestützten Studien, die in den Regionen der Transmembrandomänen 4 bis 6 potentielle Interaktionszentren prognostizierten (Filizola & Weinstein, 2005). Die Ergebnisse einer, am Institut für Experimentelle Endokrinologie, Virchow-Klinikum Berlin, angefertigten Diplomarbeit (J. Genetzky, 2008) weisen dagegen der TM3 und der icl2 eine wichtige Rolle bei der Homodimerisierung des MC4R zu.

Nicht unterschätzt werden darf die veränderte Tertiärstruktur der trunkierten Konstrukte und die damit verbundene Konformationsänderung innerhalb der Plasmamembrane dar, was wiederum die Interaktion mit anderen Rezeptormolekülen beeinflussen kann.

4.2 Untersuchung der Auswirkungen der Interaktionen auf den MC3R-vermittelten cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweg

Die Dimerisierung modifiziert nicht nur den Transport, sondern auch die Pharmakologie und die Signalisierung eines Rezeptors. Der spezifische Ligand von einem der beiden interagierenden Rezeptormoleküle kann beispielsweise über den zweiten Rezeptor oder aber über einen neu aufgebauten Signaltransduktionsweg signalisieren. Mittels heterologer Expressionssystemen kann ein sogenannter „biochemischer Fingerabdruck“ für jedes Heterodimer ermittelt werden (Franco et al., 2007). Anhand dieses „Fingerabdrucks“ ist es letztendlich möglich Dimere im Zentralnervensystem zu detektieren. Die funktionelle Charakterisierung von Heterodimeren bildet

durch die Aufdeckung von vielfältigen regulatorischen Ansatzpunkten die Grundlage für die Entwicklung von neuen pharmakologischen Präparaten.

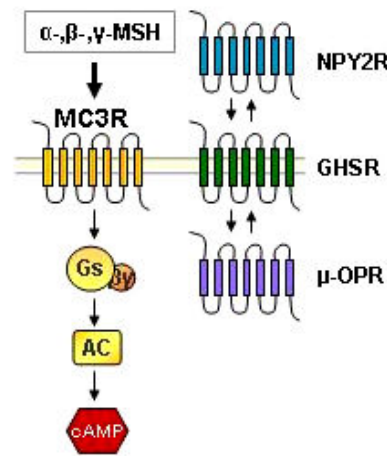


Abbildung 42: Funktionelle Charakterisierung der MC3R vermittelten cAMP-Akkumulation für die Koexpression von MC3R mit NPY2R, μ -OPR und GHSR.

Transient kotransfizierte COS-7-Zellen wurden hinsichtlich der α -, β - und γ -MSH-induzierten cAMP-Akkumulation untersucht. NPY2R und μ -OPR sind G_i -Protein-koppelnde Rezeptoren, wohin gegen der GHSR zu den G_q -Protein-koppelnden Rezeptoren gehört. Die Stimulation von MC3R durch einen Agonisten führt zur Aktivierung von Gs-Proteinen. Die $G\alpha_s$ -Untereinheit realisiert die Aktivierung der Adenylat-Cyclase.

4.2.1 Funktionelle Charakterisierung der MC3R-vermittelten cAMP-Akkumulation für die Koexpression von MC3R mit NPY2R bzw. μ -OPR

Trotz der nicht ganz kongruenten Ergebnisse der Interaktionsstudien mittels FRET und Sandwich-ELISA für die Koexpressionen von NPY2R bzw. μ -OPR mit MC3R wurden diese Kombinationen im Verhältnis 1:1 in COS-7-Zellen transient kotransfiziert. Die Liganden-abhängige Akkumulation des sekundären Botenstoffes cAMP wurde für diese Kombinatoriken bestimmt und mit denen des MC3R Homodimer verglichen. Unveröffentlichte Studien aus unserer Arbeitsgruppe wiesen keine Interaktion zwischen dem MC3R und dem rM3-Rezeptor (Ratten-muscarine Rezeptor 3) nach. Eine Interaktions-abhängige Modifikation der MC3R vermittelten cAMP-Akkumulation in transient transfizierten COS-7-Zellen kann daher für die Koexpression der beiden Rezeptoren ausgeschlossen werden. Zur Gewährleistung von vergleichbaren Koexpressionsbedingungen und Transfektionsverhältnissen wurden MC3R und rM3R koexprimiert und zum Vergleich herangezogen.

Der über den MC3R vermittelte Signaltransduktionsweg ist weitestgehend bekannt. Die Aktivierung des heterolog exprimierten Rezeptors führt zur Gs-Protein-vermittelten Stimulation der Adenylat-Cyclase und damit zum Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration (siehe Abb. 42). Dieser sekundäre Botenstoff gehört zu den am besten untersuchten intrazellulären Signalen (Schmitt & Stork, 2000). Die funktionelle Charakterisierung der Interaktionen von MC3R konzentriert sich daher auf mögliche Modifikationen des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges.

(A) Interaktions-unabhängige Modifizierung der MC3R-vermittelten cAMP-Akkumulation

Eine signifikante Reduktion der intrazellulären cAMP-Spiegel konnte für die Koexpression von NPY2R bzw. μ -OPR mit MC3R im Vergleich zum rM3R+MC3R-Ansatz (MC3R Homodimer) nach der Stimulation mit jeweils 1 μ M β - sowie γ - MSH beobachtet werden (Ergebnisse 3.2.1). Eine Modifikation der α -MSH-induzierten cAMP-Spiegel blieb aus. Sowohl der NPY2R und als auch der μ -OPR gehört zu den G_i -Protein-koppelnden Rezeptoren. Im Zuge der durch die Stimulation der beiden Rezeptoren vermittelt Signaltransduktion kommt es zur Hemmung der Aktivität der Adenylat-Cyclase und demzufolge auch zur Reduktion des sekundären Botenstoffes cAMP. Da für einige GPCR eine Liganden-unabhängige Signalisierung beobachtet werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass die hier beobachtete Reduktion des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges des MC3R möglicherweise nicht auf eine spezifische Rezeptor-Rezeptor-Interaktion sondern auf die Basalaktivität von NPY2R oder μ -OPR zurückgeführt werden kann (siehe Abb. 43). Allerdings ist bisher nur für den μ -OPR eine basale G-Protein-Kopplung in Abwesenheit seines Agonisten beschrieben worden (Burford et al., 2000). Die konstitutive Aktivität des μ -OPR ermöglicht eine antagonistische Regulation der Adenylat-Cyclase-Aktivität unabhängig von der MC3R-abhängigen Stimulation der cAMP-Produktion. Eine Reduktion der basalen cAMP-Akkumulation konnte nicht nur für die Koexpression von μ -OPR und MC3R sondern auch für NPY2R und MC3R bestimmt werden (Ergebnisse 3.2.1, Abb. 25). Die Inhibierung der cAMP-Produktion wird nicht nur über die $G_{i\alpha}$ -Untereinheit vermittelt. Eine wesentlich stärkere Modulation der Adenylat-Cyclase-Aktivität erfolgt durch den $G_{\beta\gamma}$ -Komplex (Sunahara & Taussig, 2002). Die Isoformen 1, 3 und 8 der Adenylat-Cyclase werden beispielsweise durch das $G_{\beta\gamma}$ -Dimer negativ reguliert, wobei auch die stimulatorischen Effekte von $G_{s\alpha}$, Forskolin und Ca^{2+} -Calmodulin inhibiert werden.

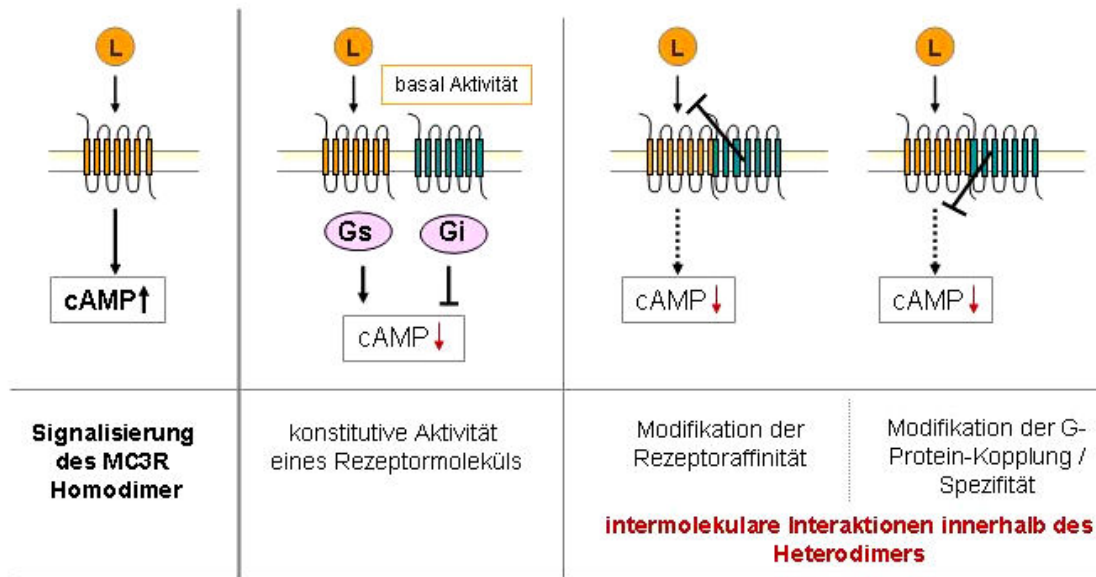


Abbildung 43: Graphische Darstellung der Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung der Koexpression des MC3R mit NPY2R und μ -OPR

(B) Interaktions-abhängige Modifizierung der MC3R-vermittelten cAMP-Akkumulation

Für eine spezifische Interaktion zwischen NPY2R bzw. μ -OPR und MC3R sprechen die EC_{50} -Werte, die anhand von Konzentrations-Wirkungskurven bestimmt werden konnten. Im Fall von β -MSH war eine fast 4mal höhere Konzentration des MC3R-Agonisten für die halbmaximale Stimulation der Koexpressionen NPY2R+MC3R sowie μ -OPR+MC3R im Vergleich zur rMC3R+MC3R Kotransfektion notwendig (Ergebnisse 3.2.1, Tabelle 8). Eine Interaktions-bedingte Konformationsänderung des MC3R wäre eine mögliche Erklärung für die verminderte Rezeptoraktivität. Intermolekulare Interaktionen innerhalb eines Heterodimers können die Affinität eines Rezeptormoleküls gegenüber seinem endogenen Liganden positiv oder negativ beeinflussen und darüber die Signalisierung dieses Rezeptormoleküls modifizieren (Franco et al., 2007). Die Reduktion der maximalen intrazellulären cAMP-Produktion um fast 60 % nach der Stimulation mit γ -MSH kann jedoch nur teilweise durch die Verschiebung der EC_{50} -Werte erklärt werden (Ergebnisse 3.2.1). Neben einem modulatorischen Effekt auf die Rezeptoraffinität, kommt es eventuell auch zu einer verminderten oder veränderten G-Protein-Kopplung (siehe Abb. 43). Dass die Dimerisierung von GPCRs eine veränderte G-Protein-Kopplung bewirken kann, zeigen u.a. die Studien von George und Mitarbeitern (2007) zum Dopamin D1-D2-Heterodimer. Der Dopamin 2-Rezeptor signalisiert normalerweise über $G_{i/o}$ -Proteine, aber im Heterodimer konnte bei Kostimulation des Dopamin 1-Rezeptors ein Wechsel zum $G_{q/11}$ -Protein nachgewiesen werden. Eine Wiederholung der hier durchgeführten Bestimmung der cAMP-Akkumulation in

Gegenwart von Pertussistoxin würde zeigen, ob MC3R bedingt durch eine Interaktion mit NPY2R bzw. μ -OPR G_i oder zusätzlich G_s koppelt. Mit Hilfe von [35 S]GTP γ S-Bindungs-Assays (Rios et al., 2006) könnten für die Koexpressionen NPY2R+MC3R bzw. μ -OPR+MC3R mögliche Modifizierungen der G-Protein-Aktivierung im Vergleich zum MC3R Homodimer (rM3R+MC3R) untersucht werden.

Zusammengefasst weisen die mittels Sandwich-ELISA nachgewiesenen neuen Heterodimere sowie die hier besprochenen ersten Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung auf eine Dimersierung von NPY2R und μ -OPR mit MC3R hin. Die postulierten Konformationsänderungen des MC3R aufgrund von intermolekularen Interaktionen erklären möglicherweise auch die niedrigen FRET-Effizienzen, die für die einzelnen Kombinatoriken gemessen wurden und auf eine ungünstige sterische Ausrichtung der beiden Fluorochrome zurückgeführt werden kann.

4.2.2 Funktionelle Charakterisierung der Stimulation der Koexpression von MC3R und GHSR mit einem Liganden

Im Gegensatz zur Koexpression von MC3R mit NPY2R bzw. μ -OPR führte die Stimulation von COS-7-Zellen, welche MC3R und GHSR koexprimierten, mit den endogenen Agonisten des MC3R α -, β - und γ -MSH jedes Mal zu einem deutlichen Anstieg der intrazellulären cAMP-Spiegel (Ergebnisse 3.2.1). Für die Stimulation mit β -MSH konnte im Vergleich zum MC3R Homodimer eine Verschiebung der EC₅₀-Werte zu höheren Ligandenkonzentrationen bestimmt werden. Die zweifache β -MSH-Konzentration war notwendig um halbmaximale cAMP-Spiegel anzureichern (Ergebnisse 3.2.1, Tabelle 8). Für den MC4R wurde postuliert das β -MSH, dessen Konzentration in Abhängigkeit von der Versorgung des Körpers mit Nährstoffen variiert, bei der Signalisierung des Rezeptor und damit bei der Regulation der Nahrungsaufnahme von größerer Bedeutung ist als α -MSH (Harrold et al., 2003). Verglichen mit den EC₅₀-Werten der Koexpressionen von MC3R mit NPY2R und μ -OPR scheinen mögliche intermolekulare Interaktionen innerhalb des GHSR/MC3R Heterodimers die Rezeptoraffinität nur bedingt zu beeinflussen. Die für die Koexpression von GHSR und MC3R ermittelte Modifikation der cAMP-Akkumulation erfolgt entweder in Abhängigkeit oder unabhängig von der Interaktion der beiden GPCRs. Im Folgenden sind verschiedene Aspekte aufgelistet, die im Rahmen der Koexpression von MC3R und GHSR einen Einfluss auf die cAMP-Akkumulation haben könnten und dem entsprechend diskutiert werden:

(A) Interaktions-unabhängige Modifizierung

- hohe konstitutive Aktivität des G_q-koppelnden GHSR (4.2.2.1)
- cross talk zwischen dem MC3R-vermittelten G_s- und dem GHSR-vermittelten G_q-abhängigen Signaltransduktionsweg (4.2.2.3)

(B) Interaktions-abhängige Modifizierung

- intermolekulare Interaktionen beeinflussen die Ligandenbindung oder die Signalisierung von MC3R (4.2.2.2)
- Veränderte G-Protein-Kopplung des GHSR/MC3R Heterodimers (4.2.2.3)
- hohe konstitutive Aktivität des G_q-koppelnden GHSR (4.2.2.1)

4.2.2.1 G_{q/11}-Phospholipase C-vermittelte Signaltransduktion (Ligand: Ghrelin)

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Stimulation des mit GHSR koexprimierten MC3R einen Anstieg der charakteristische Signaltransduktion dieses G_s-Protein-koppelnden Rezeptors bewirkt, wurde der GHSR-vermittelte Signalweg untersucht. Die Bindung des Peptidhormons Ghrelin an den GHSR initiiert die Interaktion mit einem G_{q/11}-Protein, dessen Aktivierung einen Phospholipase-C-vermittelten (PLC) Signalweg anschaltet. Dieser bewirkt u.a. die Erhöhung des sekundären Botenstoffes Inositoltriphosphat (IP₃), welcher die Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus intrazellulären Speichern reguliert. Die Erhöhung von IP₃ wurde auch unabhängig von der Liganden-vermittelten Stimulation des GHSR beobachtet (Holst & Schwartz, 2004). Mit Hilfe des im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit verwendeten IP-One-ELISA wurde nicht direkt die Konzentration von IP₃ sondern von IP₁, einem stabilen Abbauprodukt des Inositoltriphosphat, nachgewiesen und so die Aktivierung sowie die basale Aktivität des GHSR überprüft (Material & Methoden 2.6.3). Anhand der Bestimmung der intrazellulären Inositolphosphat (IP)-Akkumulation konnte die Aktivierung des einzeln- sowie des mit MC3R koexprimierten GHSR durch seinen endogenen Liganden Ghrelin in COS-7-Zellen nachgewiesen werden (Ergebnisse 3.3.1). Im Unterschied zu Chow und Mitarbeiter (2008), die einen Einfluss auf die konstitutive Aktivität für die Heterodimersierung des GHSR mit dem Prostaglandin-E₂-Rezeptor sowie mit dem Thromboxan-A₂-Rezeptor zeigen konnten, wurde im Zuge der hier durchgeführten Untersuchungen keine Modifikation des G_{q/11}-PLC-vermittelten Signaltransduktionsweges beobachtet.

4.2.2.1.1 MC3R-vermittelte Aktivierung des G_q -PLC-abhängige Signaltransduktionsweges (Ligand: α -MSH)

In mehreren Studien konnte die duale Kopplung von G_s - und G_q -Proteinen durch den MC3R gezeigt werden (Kim et al., 2002). Daher signalisiert dieser GPCR nicht nur über den sekundären Botenstoff cAMP sondern auch über den PLC-abhängigen Signalweg, der die Freisetzung von Inositoltriphosphat (IP₃) beinhaltet (Konda et al., 1994). Nach einem Anstieg der intrazelluläre IP-Spiegel wurde mit steigenden α -MSH-Konzentrationen eine Inhibierung des sekundären Botenstoffes beobachtet. Die daraus resultierende Konzentrations-Wirkungskurve wird als biphasisch bezeichnet (siehe Abb. 44). Die parallel von Konda und Mitarbeitern (1994) erstellt Konzentrations-Wirkungskurve für die α -MSH-abhängige cAMP-Akkumulation machte dagegen eine monophasische Regulation hinsichtlich der Aktivierung dieses sekundären Botenstoffes deutlich (siehe Abb. 44). Ein Anstieg von IP₃ wurde im Rahmen dieser Studie nur mit Ligandenkonzentrationen unterhalb von 10^{-11} M erzielt, mit steigenden Konzentrationen kam es zur Reduktion von IP₃. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Produktion von Inositoltriphosphat über die Aktivität der PKA reguliert wird. Kim und Mitarbeiter (2002) beschrieben eine signifikante Erhöhung der intrazellulären IP-Produktion nach einer Stimulation des MC3R mit 10^{-8} M α -MSH. Möglicherweise konnte eine Aktivierung des PLC-vermittelten Signalweges über MC3R im Rahmen der hier vorgelegten Untersuchung nicht beobachtet werden, da die transient kotransfizierten COS-7-Zellen mit relativ hohen Ligandenkonzentrationen (1 μ M α - bzw. γ -MSH) stimuliert wurden (Ergebnisse 3.3.1). Zum jetzigen Zeitpunkt kann daher keine konkrete Aussage hinsichtlich eines möglichen Einflusses der Koexpression von MC3R mit GHSR hinsichtlich der MC3R-vermittelten PLC-Aktivierung getroffen werden.

Die 3. intrazelluläre Schleife spielt bei der Signalisierung von GPCR eine wesentliche Rolle. Auch Konda und Mitarbeiter (1994) wiesen nach, dass eine Phosphorylierung des Rezeptors durch PKA in dieser Region essentiell für die duale (G_s und G_q) G-Protein-Kopplung des MC3R ist. Ob intramolekulare Interaktionen innerhalb des GHSR/MC3R Heterodimers möglicherweise diese Phosphorylierung beeinträchtigen, werden weiterführende Untersuchungen zeigen.

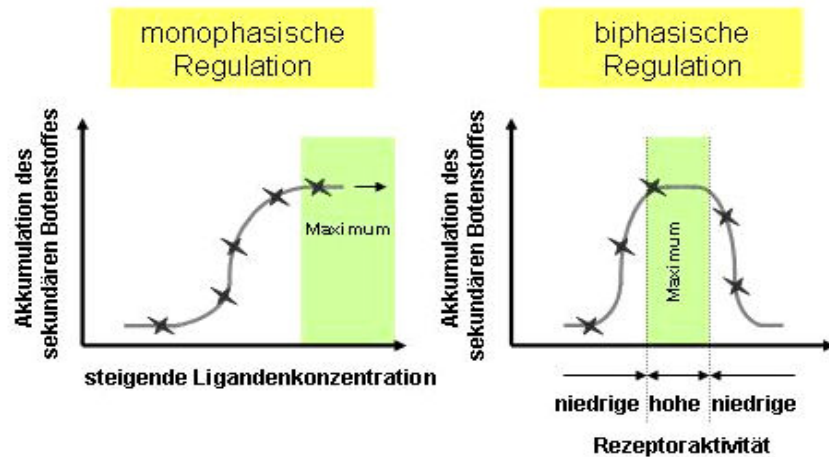


Abbildung 44: Illustration von mono- und biphasischer Regulation am Beispiel der Akkumulation eines sekundären Botenstoffes.

Die biphasische Regulation von biologischen Systemen ist vergleichbar mit einem Breitbandfilter (Levchenko et al., 2004). Die vielfältigen extrazellulären Signale werden dahin gehend gefiltert, dass nur unter optimalen Bedingungen (z.B. ab einer definierten Ligandenkonzentration) eine Weiterleitung der Signale ins Zellinnere erfolgt und eine spezifische Antwort ausgelöst werden kann. Bei einer monophasischen Regulation wird mit steigender Ligandenkonzentration eine Art Sättigungszustand hinsichtlich einer Signalisierung erreicht.

4.2.2.2 Funktionelle Charakterisierung der Kostimulation der Koexpression von MC3R und GHSR mit zwei Liganden

Die bisherigen Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung der Koexpression von MC3R mit GHSR:

- (1) Die nachgewiesene Inositolphosphat-Akkumulation des koexprimierten GHSR in Abwesenheit von Ghrelin (konstitutive Aktivität) hat keinen regulatorischen Einfluß auf die basale cAMP-Akkumulation des Heterodimers (Ergebnisse 3.3.1).
- (2) Es bedarf der Stimulation des mit GHSR koexprimierten MC3R um eine Veränderung der intrazellulären cAMP-Spiegel auszulösen (Ergebnisse 3.2.1).
- (3) Eine zusätzliche Erhöhung der cAMP-Akkumulation konnte durch die Kostimulation des mit MC3R koexprimierten GHSR mit 500 nM Ghrelin erzielt werden (Ergebnisse 3.3.2).

Bei einer konstanten Stimulation des MC3R mit 1 μM $\alpha\text{-MSH}$ konnte eine Erhöhung der cAMP-Akkumulation proportional zu den steigenden Ghrelin-Konzentrationen ermittelt werden

(monophasische Regulation, siehe Abb. 44), ganz im Gegensatz zur biphasischen Regulation der cAMP-Produktion bei einer kontinuierlichen Stimulation des MC3R mit $1\mu\text{M}$ $\gamma\text{-MSH}$ und einem gleichzeitigen Anstieg der Aktivierung des GHSR.

Viele GPCRs weisen eine so genannte allosterische Bindungsstelle auf, die räumlich getrennt von der orthosterischen, der regulären Ligandenbindungsstelle liegt (May et al, 2007; siehe Abb. 45). Über die Bindung von allosterischen Effektoren kommt es zu Konformationsänderungen, welche die Bindungsaffinität hinsichtlich eines Liganden oder die Effizienz der Signaltransduktion modulieren. Als allosterischer Modulator wird jeder Ligand bezeichnet, der an die allosterische Bindungsstelle bindet, das können z.B. auch Metall-Ionen sein. Im Fall vom MC1R und MC4R sowie dem $\mu\text{-OPR}$ wird durch die Bindung von Zn^{2+} an die allosterische Bindungsstelle der GPCRs die Aktivität des jeweiligen orthosterischen Liganden moduliert (May et al., 2007). Die allosterische Modulation eines GPCR erfolgt nur bei gleichzeitiger Bindung eines Liganden an die orthosterische Bindungsstelle, wobei es nicht unbedingt zur Modulation der orthosterischen Ligandenbindung kommt. Sieht man das GHSR/MC3R Heterodimer als eine funktionelle Einheit mit zwei potentiellen Ligandenbindungsstellen an, dann wäre es vorstellbar, dass über eine der beiden Bindungsstellen eine allosterische Regulation des Heterodimers erfolgen könnte, wobei einer der beiden Liganden zu einem allosterischen Effektor wird.

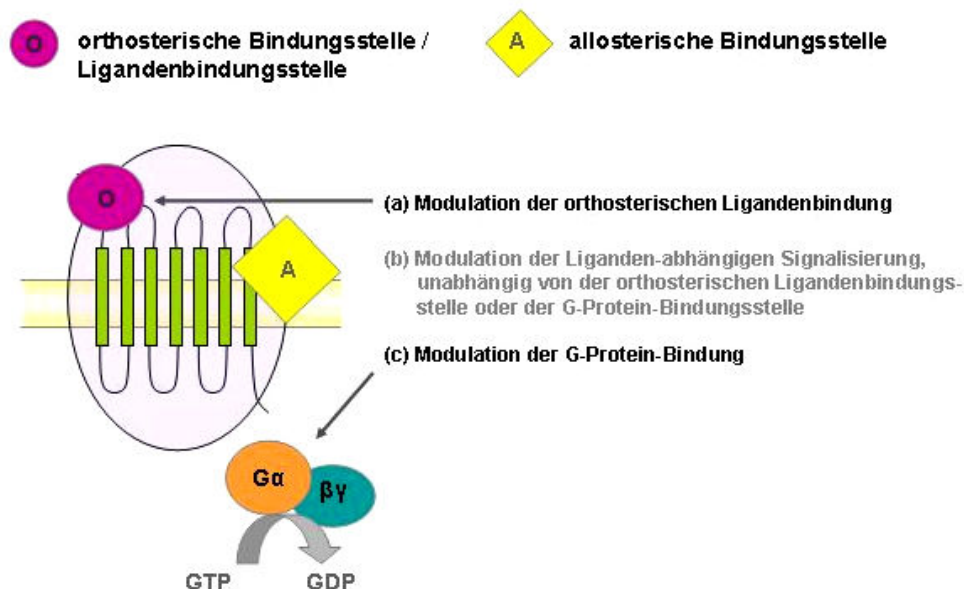


Abbildung 45: Allosterische Modulation von GPCRs (Modifiziert nach May et al., 2007).

Die Bindung von Komponenten an die allosterische Bindungsstelle kann direkt (a und c, *schwarz*) oder indirekt (b, *grau*) die Ligandenbindung an die orthosterische Bindungsstelle oder die G-Protein-Kopplung von GPCRs modulieren.

Die Ergebnisse der Ligandenbindungsstudie (Ergebnisse 3.3.3) zeigten eine verbesserte Ligandenbindung des MC3R innerhalb des GHSR/MC3R Heterodimers gegenüber dem MC3R Homodimer. Dies kann möglicherweise auf intramolekulare Interaktionen zurückgeführt werden, die eine Konformationsänderung des koexprimierten MC3R bewirken und zu einer verbesserten Ligandenbindung führen. Eine Kostimulation mit 30 nM Ghrelin hatte keinen Einfluß auf die Verdrängung von ^{125}I -NDP- α -MSH durch die kalten Liganden NDP-, α -, β -, bzw. γ -MSH. Dies schließt Ghrelin als potentieller allosterischer Effektor der Ligandenbindung des GHSR/MC3R Heterodimers aus. Abgesehen davon wäre aber eine Modulation der G-Protein-Kopplung sowie der Signalisierungseffizienz des Heterodimers durch Ghrelin möglich. Ein Hinweis darauf gibt die ca. 40 % höhere cAMP-Produktion infolge einer Kostimulation des GHSR/MC3R Heterodimers mit Ghrelin und γ -MSH im Vergleich zur Stimulation mit Ghrelin und α -MSH (Ergebnisse 3.3.2).

Da sowohl für die Stimulation mit α -, β - und γ -MSH des mit GHSR koexprimierten MC3R als auch für die Kostimulation beider GPCRs mit Ghrelin und α - bzw. γ -MSH eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel beobachtet wurde, ist zu vermuten, dass diese Modifizierung des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges nach demselben Prinzip erfolgt. Der Umfang der cAMP-Akkumulation wird scheinbar Liganden-abhängig reguliert. Die Stimulation des mit dem GHSR koexprimierten MC3R mit α -MSH führt im Vergleich zum MC3R Homodimer zu einer 70% igen Erhöhung des cAMP-Spiegels, wohingegen mit γ -MSH nur ein 30% iger Anstieg ermittelt werden konnte (Ergebnisse 3.2.1, Tabelle 8).

4.2.2.3 Modifizierung des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges über die Adenylat-Cyclase

Die Aktivierung eines Signaltransduktionsweges kann die Modifizierung einer Komponente eines zweiten Signalweges bewirken, es kommt also zum cross talk zwischen zwei Regulationssystemen. Ein potentieller Knotenpunkt für solch einen cross talk zwischen dem G_s -abhängigen Signaltransduktionsweg des MC3R und dem $G_{q/11}$ -abhängigen Signalweg des GHSR stellt die Adenylat-Cyclase (AC) dar (siehe Abb. 46).

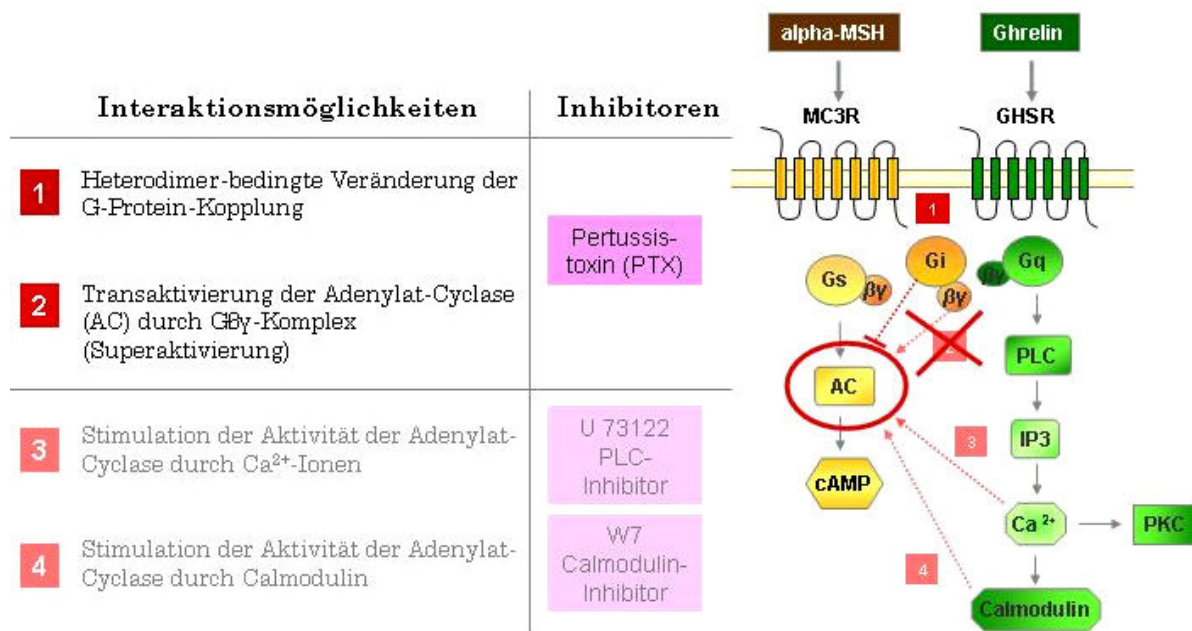


Abbildung 46: Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich möglicher cross talks zwischen dem Signaltransduktionsweg des MC3R und des GHSR.

Die Adenylat-Cyclase ermöglicht die Integration von regulatorischen Effekten, die über G_s -, G_i - und G_q -Protein-gekoppelten Rezeptoren übermittelt werden. Um die markierten Interaktionsmöglichkeiten zwischen dem MC3R- und dem GHSR-vermittelten Signalweg überprüfen zu können wurden unterschiedliche Inhibitoren verwendet. Mittels PTX konnte eine Heterodimer-bedingte Veränderung der G-Protein-Kopplung (PTX) bestimmt werden (1). Gleichzeitig wurde eine Transaktivierung der Adenylat-Cyclase durch den $G_{\beta\gamma}$ -Komplex von G_i -Proteinen widerlegt (2). Der Einfluß von Ca^{2+} -Ionen (3) und Calmodulin (CaM) im Zuge der Regulation der Adenylat-Cyclase-Aktivität konnte allein durch den Einsatz der Inhibitoren U 73122 bzw. W7 nicht vollständig aufgeklärt werden.

Die neun Isoformen der Adenylat-Cyclaselassen lassen sich anhand von funktionellen Gemeinsamkeiten in drei Gruppen einteilen (siehe Tabelle 2). Die erste Gruppe umfasst die AC I, III und VIII, deren Aktivität durch $G_{\beta\gamma}$ -Komplexe inhibiert und durch Ca^{2+} /Calmodulin (CaM) stimuliert wird. Die Aktivierung der AC II, IV und VII erfolgt durch $G_{\beta\gamma}$ -Komplexe nur bei gleichzeitiger Stimulation durch G_{α_s} und wird auch als Superaktivierung bezeichnet. Die AC V und VI werden durch submikromolare Konzentrationen von Ca^{2+} sowie durch $G_{\alpha_{i,o,z}}$ -Untereinheiten inhibiert. Isoformen aller drei Gruppen werden durch G_{α_s} -Untereinheiten und Forskolin stimuliert. (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Die Isoformen der Adenylat-Cyclase und ihre jeweilige Regulation (nach Sunahara & Taussig, 2002; Defer et al., 2000)

Gruppe	Isoformen	Expression in COS-7-Zellen (RT-PCR)	Regulation	
			Aktivatoren	Inhibitoren
I	AC I	+	$G\alpha_s$ -Untereinheit Forskolin	$G\alpha_o$ -Untereinheit $G\beta\gamma$ -Komplex
	AC III	+	$Ca^{2+ a}$ / CaM	
	AC VIII	-	PKC	
II	AC II	-	$G\alpha_s$ -Untereinheit Forskolin	
	AC IV	-	$G\beta\gamma$ -Komplex ^b	
	AC VII	-	(PKC; AC II und VII)	
III	AC V	-	$G\alpha_s$ -Untereinheit Forskolin	Ca^{2+} $G\alpha_{i, o, z}$ -Untereinheit PKA
	AC VI	+		
IV	AC IX	/	$G\alpha_s$ -Untereinheit	Ca^{2+}

Abkürzungen: AC, Adenylat-Cyclase; CaM, Calmodulin; PKA, Proteinkinase A; PKC, Proteinkinase C

^a Intrazelluläres Ca^{2+} kein Effekt, nur über Ionenkanäle aufgenommenes Calcium aktiviert die Adenylat-Cyclasen

^b Stimulation durch $G\beta\gamma$ erfolgt nur bei Kostimulation der Adenylat-Cyclase durch $G\alpha_s$

4.2.2.3.1 Heterodimer-bedingte Veränderung der G-Protein-Kopplung (1) + (2)

Die Aktivierung der Adenylat-Cyclase wird nicht nur über die $G\alpha$ -Untereinheit von G_s -Proteinen reguliert sondern im Fall der AC II, IV und VII auch über den $G\beta\gamma$ -Komplex von G_i -Proteinen. Daher könnte die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel, die für die Koexpression von MC3R mit GHSR ermittelt wurde, durch eine veränderte G-Protein-Kopplung erklärt werden.

Ein Anstieg der α -MSH-induzierten cAMP-Akkumulation im Anschluß an die Inkubation des GHSR/MC3R Heterodimers mit Pertussistoxin (PTX) lässt auf eine veränderte G-Protein-Kopplung schließen (Ergebnisse 3.3.4.2, Abb. 33). Die Interaktion des GHSR/MC3R Heterodimers mit G_i -Proteinen führt allerdings nicht zur Superaktivierung durch den $G\beta\gamma$ -Komplex, sondern zur Inhibierung der Adenylat-Cyclase-Aktivität, die durch PTX aufgehoben

wird. Da eine Kopplung von G_i -Proteinen nicht für das MC3R Homodimer ermittelt werden konnte, ist diese Verschiebung in der G-Protein-Interaktion auf die Heterodimersierung von MC3R mit GHSR zurück zuführen. Über einen Wechsel von einer G_q - zu einer G_i -Protein-Kopplung ist nur wenig bekannt. Allerdings konnte für die Dimersierung von GHSR mit dem G_s -koppelnden Dopamin-1-Rezeptor (D1R) auch eine Verschiebung in der G-Protein-Bindung beobachtet werden (Jiang et al., 2006). In diesem Fall wurde eine Superaktivierung der Adenylat-Cyclase II, aufgrund einer Reduktion der D1R-vermittelten cAMP-Akkumulation des Heterodimers durch PTX in HEK293-Zellen, postuliert. Die Bindung von G_i -Proteinen durch das GHSR/D1R Heterodimer führt zur Dissoziation des aktiven $G\beta\gamma$ -Komplexes, der in Gegenwart der $G\alpha_s$ -Untereinheit die Superaktivierung der Adenylat-Cyclase II vermittelt. Dagegen beruht die Verschiebung der G_s -Protein-Kopplung des β_2 -Adrenergen-Rezeptors zur G_i -Kopplung nachweislich auf einer PKA-abhängigen Phosphorylierung des Rezeptors (Daaka et al., 1997). Die von Chai und Mitarbeitern (2007) beobachtete MC3R-vermittelte Phosphorylierung von ERK1/2 erfolgt in HEK293-Zellen über den G_i -Protein-PI3K-Signaltransduktionsweg. Ob die duale G-Protein-Bindung des MC3R in diesem Fall auch über eine Phosphorylierung durch die PKA realisiert wird ist nicht bekannt.

4.2.2.3.2 Regulation der Adenylat-Cyclase-Aktivität über Ca^{2+} und Calmodulin sowie PKC (3) + (4)

Neben der Regulation der neun Isoformen der Adenylat-Cyclase über die unterschiedlichen G-Proteine, spielen auch andere Effektoren wie beispielsweise Ca^{2+} und Calmodulin sowie PKC eine wesentliche Rolle. Die selektive Inhibierung des GHSR-vermittelten G_q -abhängigen Signaltransduktionsweges durch U-73122, einem PLC-Inhibitor, hatte keinen Einfluss auf die cAMP-Akkumulation des GHSR/MC3R Heterodimers. Somit konnte bestätigt werden, dass intrazelluläres Ca^{2+} von IP_3 -sensitiven Speichern keinen regulatorischen Effekt auf die AC I, III und VIII hat (Fagan et al., 2000; Gu & Cooper, 2000). Die Inhibierung der PLC durch U-73122 führt darüber hinaus zur Hemmung der Phosphokinase C (PKC). Weder die Stimulation mit α -MSH noch die Kostimulation von MC3R und GHSR mit α -MSH und Ghrelin führte in Gegenwart von U-73122 zu einem Anstieg der cAMP-Akkumulation. Daher kann eine zusätzliche Stimulation der Adenylat-Cyclase-Aktivität durch die PKC, welche über die G_q -Kopplung des GHSR in Abwesenheit und in Gegenwart des Agonisten Ghrelin aktiviert wird, ausgeschlossen werden. Dafür spricht auch die Beobachtung, dass die Aktivierung des mit dem MC3R koexprimierten GHSR durch Ghrelin nicht zu einer Veränderung des intrazellulären cAMP-Spiegels führte (siehe Ergebnisse 3.3.4.3).

Der sekundäre Botenstoff IP₃ reguliert nur die Öffnung von Ionenkanälen, die sich in der Membran von internen Ca²⁺-Speichen der Zelle befinden, wie beispielsweise dem endoplasmatischen Retikulum. Darüber hinaus wird die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration über ATP-getriebenen Ca²⁺-Pumpen und Na⁺/Ca²⁺-Austauscher in der Plasmamembran gesteuert. Calmodulin wird durch die Bindung von 4 Ca²⁺-Ionen zu einem Steuerungselement, das mit anderen Proteinen (u.a. GPCR, Zhang et al., 2005) in Wechselwirkung treten kann. Um die Rolle von Calmodulin hinsichtlich der cAMP-Akkumulation zu untersuchen, wurde versuchsweise der Calmodulin-Inhibitor W7 verwendet. Sowohl für das MC3R Homodimer als auch GHSR/MC3R Heterodimer konnte in Gegenwart von W7 eine signifikante Reduktion der α -MSH-vermittelten cAMP-Produktion beobachtet werden (siehe Ergebnisse 3.3.4.4). Die im Anschluß an die Inkubation mit W7 bestimmte Reduktion des kostimulierten Homodimers bzw. des Heterodimers trat im gleichen Verhältnis auf wie im Fall der Einfach-Stimulation mit α -MSH. Somit liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei der beobachteten signifikanten Reduktion der cAMP-Spiegel um einen generellen toxischen Effekt handelt. Die

basale cAMP-Akkumulation von COS-7-Zellen ist zu niedrig um eine Aussage bezüglich der Toxizität der eingesetzten W7-Konzentration treffen zu können. Die Angaben wurden einem Protokoll von Hatae und Mitarbeitern (2002) entnommen, die durch den Einsatz des Calmodulin-Inhibitors eine Aktivierung der Adenylat-Cyclase durch Calmodulin und Ca²⁺ zeigen konnten. Da im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen nur mit einer W7-Konzentration gearbeitet wurde, sind zusätzliche Messreihen mit variierenden Konzentrationen und Inkubationszeiten notwendig, um die Rolle von Calmodulin innerhalb der cAMP-abhängigen Signaltransduktion von MC3R im Homodimers und um GHSR/MC3R Heterodimer abschätzen zu können. Von Interesse ist dabei vor allem der Aspekt einer möglichen direkten Interaktion des Calmodulins mit einem GPCR. Welche Bedeutung dabei die Ausbildung eines Heterodimers hat ist bisher noch unklar (Zhang et al., 2005).

Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit wurde versucht mit Hilfe von chemischen Inhibitoren verschiedene potentielle Effektoren der einzelnen Isoformen der Adenylat-Cyclase zu analysieren. Seit kurzem werden für solche Untersuchungen auch verstärkt siRNAs verwendet. Sie gewährleisten die spezifische Expressions-Inhibierung von einem Enzym, die anhand von SDS-PAGE-Analysen leicht kontrollieren werden kann. Zudem wird die Säugerzelllinie über die transienten Kointransfektion hinaus, bei der auch die siRNA eingebracht wird, nicht unnötig durch zusätzliche Inkubationsschritte gestresst. Um die Verschiebung der G-Protein-Kopplung für das GHSR/MC3R Heterodimer im Vergleich zum MC3R Homodimer hinsichtlich möglicher latenter

Bindungen von G_s- bzw. G_q-Proteinen zu untersuchen, wurde mit der Suche nach effizienten siRNAs begonnen und in weiterführenden Experimenten getestet.

4.2.2.4 Heterodimersierung und funktionelle Charakterisierung der MC3R- und GHSR-Mutanten

Zum besseren Verständnis der Interaktion von GHSR und MC3R wurden verschiedene Mutanten der beiden GPCRs hinsichtlich eines möglichen Einflusses auf die Dimersierung und auf den cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweg untersucht. Bei diesen Mutationen handelt es sich um natürlich vorkommende Mutationen, die in adipösen Patienten gefunden wurden.

Trotz der nachgewiesenen intrazellulären Retention der heterozygoten Mutation MC3R I183N konnten signifikante FRET-Effizienzen für die Koexpression mit dem MC3R-Wildtyp sowie dem GHSR bestimmt werden. Eine Verbesserung der reduzierten Oberflächenexpression der Mutante im Zuge der Dimersierung wurde jedoch nicht beobachtet (siehe Ergebnisse 3.3.5, Abb. 37). Der von Rached und Mitarbeitern (2003) beschriebene komplette Funktionsverlust konnte daher bestätigt werden (3.3.5, Abb. 38).

Für die beiden Mutanten A204E und F279L des GHSR konnten ebenfalls eine stabile Dimerisierung mit dem GHSR-Wildtyp sowie dem MC3R mittels FRET nachgewiesen werden. Die Koexpression von GHSR A204E und F279L mit dem MC3R bewirkte eine Reduktion der α -MSH-induzierten cAMP-Akkumulation im Vergleich zum GHSR/MC3R Heterodimer und entsprach damit letztlich den Werten die für das MC3R Homodimer ermittelt wurden (Ergebnisse 3.3.5, Abb. 40). Zwei Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass beide Mutationen zu einer Reduktion bzw. dem Verlust der hohen konstitutiven Aktivität, die für den GHSR charakteristisch ist, führen (Holst et al., 2003; Liu et al., 2007). Ein Cluster von aromatischen Resten, welche sich auf der Innenseite der TM VI und VII befinden, ist für die konstitutive Aktivität des GHSR von großer Bedeutung (Pantel et al., 2006). Da die Mutation F279L in der TMVI lokalisiert ist, wird vermutet, dass der Mutations-bedingte Austausch der Aminosäure an dieser Stelle zu einer Veränderung der Struktur dieser Domäne führt (Liu et al., 2007). Die Mutation A204E bedingt möglicherweise ebenfalls eine Konformationsänderung, die dazuführt, dass sich der Rezeptor nicht mehr in einem aktiven Zustand befindet. Die ermittelte Reduktion der cAMP-Akkumulation kann daher eventuell auf die veränderte Konformation, der mit dem MC3R interagierenden Rezeptormoleküle zurückgeführt werden. Der GHSR-Wildtyp befindet sich in einem vor aktivierten Zustand, diese spezifische Rezeptorkonformation könnte bei der Heterodimerisierung den Übergang des MC3R vom inaktiven in den aktiven Zustand positiv beeinflussen. Diese

Interaktions-bedingte Konformationsänderung des MC3R würde sich letztendlich in einer erhöhten Signalisierung des Rezeptors wieder spiegeln. Der eher inaktive Zustand der Rezeptormutanten A204E und F279L hemmt möglicherweise die Konformationsänderung, die für eine effiziente Aktivierung des MC3R notwendig ist.

4.2.2.5 Physiologische Relevanz der Heterodimersierung von MC3R mit GHSR

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die hohe konstitutive Aktivität des GHSR zu einer Liganden-unabhängigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP-responsibles Element-Bindungsprotein) führt (Holst & Schwartz, 2004)(siehe Abb. 47A). Die Phosphorylierung der CRE-bindenden Proteine (CREB) erfolgt dabei über die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase IV. Man geht heute davon aus, dass über die konstitutive Aktivität des GHSR ein so genannter set-point hinsichtlich der Regulation des Hungergefühls aufgestellt wird, gegen den verschiedene inhibitorische Regulationssysteme steuern (z.B. Leptin, Insulin und PYY_{3-36})(Holst & Schwartz, 2004).

Die im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit ermittelte Erhöhung der intrazellulären cAMP-Akkumulation des GHSR/MC3R Heterodimers im Vergleich zum MC3R Homodimer könnte die Aktivierung von CREB und die damit verbundene Genexpression in NPY/AgRP-Neuronen unterstützen. Möglicherweise führt die Interaktion der beiden GPCRs so zu einer Erhöhung des GHSR vermittelten Hungergefühls trotz einer Leptin-vermittelten Reduktion der Nahrungsaufnahme. Dies könnte letztendlich eine Erklärung für das Naschen zwischen den Mahlzeiten oder die Wahl eines zweiten Stückes Kuchen im Anschluß an eine Mahlzeit sein (siehe Abb. 47B).

Andererseits ist diese Verstärkung des „basalen“ Hungergefühls notwendig angesichts der Tatsache, dass auch für den MC4R eine Signalisierung in Abwesenheit von einem Liganden beobachtet wurde, was folglich zum Verhungern führen könnte. Die ausreichende Versorgung des Organismus mit Nahrung ist evolutionär so essentiell, dass auch bei gut gefüllten Fettspeichern ein basales Hungergefühl aufrechterhalten wird und somit möglicherweise auch ein Antrieb für die Fortsetzung der Nahrungssuche gegeben ist.

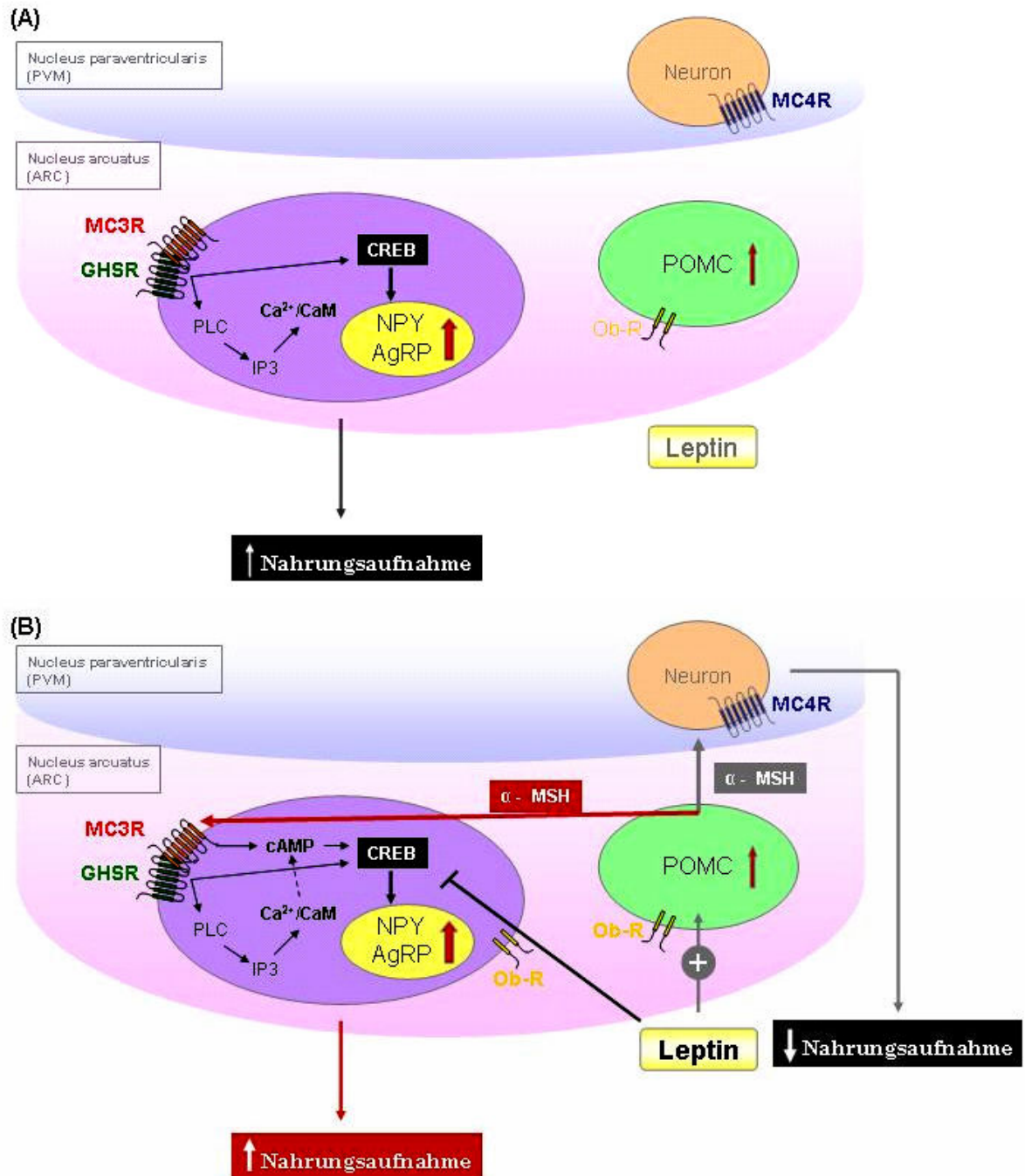


Abbildung 47: Illustration der physiologischen Relevanz des GHSR/MC3R Heterodimers.

(A) Die konstitutive Aktivität des GHSR bewirkt die Aktivierung des CREB-Transkriptionsfaktors in Abwesenheit von Ghrelin. Der GHSR legt damit einen sogenannten set-point hinsichtlich der orexigenen Appetitregulation fest. **(B)** Leptin stimuliert über die Leptin-Rezeptoren (ObRb) die Synthese von Proopiomelanocortin (POMC). Dies führt u.a. zur Freisetzung von α -MSH, einem Agonisten des MC4R (blau) und des MC3R (orange). Durch die Aktivierung des MC4R im PVN wird der anorexigene Effekt, d.h. die Reduktion der Nahrungsaufnahme vermittelt. Gleichzeitig führt die Stimulation des MC3R im ARC zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Akkumulation, die durch die Interaktion von MC3R mit GHSR (grün) noch zusätzlich gesteigert wird. Durch die verstärkte Aktivierung des CREB-Transkriptionsfaktors kommt es möglicherweise zur Expression von orexigenen Effektoren, was letztendlich, trotz der Inhibition der Sekretion des Neuropeptid Y (NPY) und des Agouti-related Protein (AgRP) über Leptin, zu Nahrungsaufnahme führt.

5 Zusammenfassung

Eine zentrale Rolle bei der hypothalamischen Appetitregulation nimmt der Leptin-Melanocortin-Weg ein, da er sowohl das anorexigene (nahrungsaufnahme-hemmende) als auch das orexigene (appetit-stimulierende) System beeinflusst. Neben den Melanocortin-Rezeptoren 3 und 4 werden weit über 40 verschiedene GPCR im Hypothalamus exprimiert, deren Rolle bei der Regulation der Energiehomöostase nicht vollständig verstanden ist (Schiöth, 2006). Die Fähigkeit der Oligo- bzw. Dimersierung als kleinste Einheit der Interaktion von GPCRs wird weitestgehend akzeptiert. Die Heterodimerisierung von hypothalamischen GPCRs konnte bisher noch nicht gezeigt werden und wurde daher im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Zum ersten Mal konnte mit Hilfe von zwei unterschiedlichen experimentellen Strategien die Interaktion von GPCRs, die in die Appetitregulation involviert sind, in zwei verschiedenen Säugerzelllinien gezeigt werden. Eine stabile Heterodimerisierung wurde zum einen für den MC4R mit dem GPR7 und zum anderen für den MC3R mit dem GHSR sowohl mittels FRET, eine RET-Methode, die im Zuge dieser Arbeit etabliert wurde, als auch anhand von Sandwich-ELISAs nachgewiesen. Um die funktionelle Relevanz der Heterodimerisierung eingehender zu untersuchen wurden die Liganden-abhängige intrazelluläre cAMP-Akkumulation, die Ligandenbindung sowie die G-Protein-Kopplung für die Koexpression des G_s -koppelnden MC3R mit dem G_q -koppelnden GHSR ermittelt. Eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel konnte infolge der Stimulation des MC3R mit α -, β - und γ -MSH und durch die Kostimulation mit Ghrelin und α - oder γ -MSH für die Koexpression von MC3R mit GHSR im Vergleich zum MC3R Homodimer gezeigt werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche G_i -Protein-Kopplung, die für die Koexpression von MC3R mit dem GHSR bestimmt wurde, eine Reduktion der Liganden-abhängigen Aktivierung der Adenylat-Cyclase zur Folge hatte. Die affinere Bindung der Liganden NDP- α -MSH, α -, β - und γ -MSH an das GHSR/MC3R Heterodimer im Vergleich zum MC3R Homodimer weist auf spezifische intermolekulare Interaktionen hin. Die Untersuchungen der Dimerisierungseigenschaften und die funktionelle Charakterisierung der mit dem MC3R kotransfizierten GHSR-Mutanten A204E und F279L legte die Vermutung nahe, dass die hohe konstitutive Aktivität des GHSR-Wildtyp eine wesentliche Rolle bei der Modifikation der cAMP-Akkumulation des GHSR/MC3R Heterodimers spielt. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob diese Modifikation auf einen cross talk zwischen dem G_s -vermittelten Signaltransduktionsweg des MC3R und dem G_q -vermittelten Signaltransduktionsweg des GHSR zurückgeführt werden kann und welchen Einfluss intermolekulare Interaktionen auf die Konformation und die Signalisierung der beiden GPCR haben.

6. Literaturverzeichnis

- Aaij C & Borst P. **1972**: The gel electrophoresis of DNA. *Biochem Biophys Acta.*, 269(2):192-200
- Acharya S & Karnik SS. **1996**: Modulation of GDP release from transducin by the conserved Glu134-Arg135 sequence in rhodopsin. *J Biol Chem.*, 271:25406-25411
- Adan RA, Tiesjema B, Hillebrand JJ, la Fleur SE, Kas MJ, de Krom M. **2006**: The MC4 receptor and control of appetite. *Br J Pharmacol.*, 149:815-827
- Agnati LF, Fuxe K, Zini I, Lenzi P, Hökfelt T. **1980**: Aspects on receptor regulation and isoreceptor identification. *Med Biol.*, 58(4):182-7
- Alousi AA, Jasper JR, Insel PA, Motulsky HJ. **1991**: Stoichiometry of receptor-Gs-adenylate cyclase interactions. *FASEB J.*, 5(9):2300-3
- Ayoub MA, Couturier C, Lucas-Meunier E, Angers S, Fossier P, Bouvier M, Jockers R. **2002**: Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem.*, 277:21522-21528
- Bagnol D. **2004**: G protein-coupled receptors in hypothalamic circuits involved in metabolic diseases. *Current Opinion in Drug Discovery & Development.*, 7(5):665-682
- Bai M, Trivedi S, Brown EM. **1998**: Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells. *J Biol Chem.*, 273(36):23605-10
- Ballesteros JA & Weinstein H. **1994**: Integrated methods for the construction of three dimensional models and computational probing of structure-function relations in G-protein coupled receptors. *Methods Neurosci.*, 25:366-428
- Barnes PJ. **2006**: Pharmacology of airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med.*, 158:123-132
- Baskin D, Breininger J, Schwartz MW. **1999**: Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes*, 48:828-833
- Berthouze M, Rivail L, Lucas A, Ayoub MA, Russo O, Sicsic S, Fischmeister R, Berque-Bestel I, Jockers R, Lezoualc'h F. **2007**: Two transmembrane Cys residues are involved in 5-HT₄ receptor dimerization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 356:642-647
- Biebermann H, Krude H, Elsner A, Chubonov V, Gudermann T, Gruters A. **2003**: Autosomal-dominant mode of inheritance of a melanocortin-4-receptor mutation in a patient with severe early-onset obesity is due to a dominant-negative effect caused by receptor dimerization. *Diabetes*, 52:2984-2988
- Bockaert J, Fagni L, Dumuis A, Marin P. **2004**: GPCR interacting proteins (GIP). *Pharmacol Ther.*, 103(3):203-21
- Bouvier M. **2001**: Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci.*, 2:274-86
- Bouvier M, Heveker N, Jockers R, Marullo S, Milligan G. **2007**: BRET analysis of GPCR oligomerization: newer does not mean better. *Nature Methods*, 4(1):3-4
- Burford NT, Wang D, Sadée W. **2000**: G-protein coupling of mu-opioid receptors (OP3): elevated basal signalling activity. *Biochem J.*, 348 Pt 3:531-7
- Butler AA, Kesterson RA, Khong K, Cullen MJ, Pellemounter MA, Dekoning J, Baetscher M, Cone RD. **2000**: A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse. *Endocrinology*, 141(9):3518-3521

- Campfield L, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. **1995**: Recombinant Mouse OB-protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, 269:546-549
- Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhang PL, Sinha MK, Considine RV. **1996**: Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet.*, 348:159-161
- Carreira MC, Camiña JP, Smith RG, Casanueva FF. **2004**: Agonist-specific coupling of growth hormone secretagogue receptor type 1a to different intracellular signaling systems. *Neuroendocrinology*, 79:13-25
- Chai B, Li JY, Zhang W, Ammori JB, Mulholland MW. **2007**: Melanocortin-3 receptor activates MAP kinase via PI3 kinase. *Regulatory Peptides*, 139:115-121
- Chen AS, Marsh DJ, Trumbauer ME, Frazier EG, Guan XM, Yu H, Rosenblum CI, Vongs A, Feng Y, Cao L, Metzger JM, Strack AM, Camacho RE, Mellin TN, Nunes CN, Min W, Fisher J, Gopal-Truter S, MacIntyre DE, Chen HY, Van der Ploeg LH. **2000**: Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet.*, 26:97-102
- Chhajlani V & Wikberg JE. **1992**: Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. *FEBS Lett*, 309:417-420
- Choen SN, Chang ACY, Hsu L. **1972**: Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria-genetic transformation of E.coli by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 69:2110-2114
- Chow KB, Leung PK, Cheng CH, Cheung WT, Wise H. **2008**: The constitutive activity of ghrelin receptors is decreased by co-expression with vasoactive prostanoid receptors when over-expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Int J Biochem Cell Biol.*, 40(11):2627-37
- Christopoulos A. **2002**: Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drug discovery. *Nature Rev Drug Discov.*, 1:198-210
- Chua SC, Jr., Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L, Leibel RL. **1996**: Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science*, 271:994-996
- Clapham DE & Neer EJ. **1997**: G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 37:167-203
- Cogé F, Guenin SP, Renouard-Try A, Rique H, Ouvry C, Fabry N, Beauverger P, Nicolas JP, Galizzi JP, Boutin JA, Canet E. **1999**: Truncated isoforms inhibit [3H]prazosin binding and cellular trafficking of native human alpha 1A-adrenoreceptors. *Biochem J.*, 343:231-239
- Coll AP, Farooqi IS, Challis BG, Yeo GS, O'Rahilly S. **2004**: Proopiomelanocortin and energy balance: insights from human and murine genetics. *J Clin Endocrinol Metab.*, 89(6):2557-62
- Cone RD, Lu D, Koppula S, Vage DI, Klungland H, Boston B, Chen W, Orth DN, Pouton C, Kesterson RA. **1996**: The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog Horm Res.*, 51:287-317
- Considine RV. **1996**: Serum immunoreactive leptin concentrations in normal weight and obese humans. *N Engl J Med.*, 334:292-295
- Cooray SN, Almiro do Vale I, Leung KY, Webb TR, Chapple JP, Egertová M, Cheetham ME, Elphick MR, Clark AJL. **2008**: The melanocortin 2 receptor accessory protein exists as a homodimer and is essential for the function of the melanocortin 2 receptor in the mouse Y1 cell line. *Endocrinology*, 149(4):1935-1941

- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ. **2004**: Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, 411(6836):480-484
- Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. **2001**: A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in human. *Diabetes*, 50:1714-1719
- Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, Purnell JQ. **2002**: Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med.*, 346:1623-1630
- Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. **1997**: Switching of the coupling of β_2 -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*, 390:88-91
- Date Y, Kijima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. **2000**: Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*, 141:4255-4261
- De Jesús ML, Sallés J, Meana JJ, Callado LF. **2006**: Characterization of CB1 cannabinoid receptor immunoreactivity on postmortem human brain homogenates. *Neuroscience*, 140:635-643
- de la Cour CD, Bjorkquist M, Sandvik AK, Bakke I, Zhao CM, Chen D, Håkanson R. **2001**: A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regulatory Peptides*, 99:141-150
- De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ. **1980**: A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled β -adrenergic receptor. *J Biol Chem.*, 255:7108-7117
- Defer N, Best-Belpomme M, Hanoune J. **2000**: Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *Am J Physiol Renal Physiol.*, 279(3):400-16
- Devost D & Zingg HH. **2004**: Homo- and hetero-dimeric complex formations of the human oxytocin receptor. *J Neuroendocrinol.*, 16(4):372-7
- Drazen DL, et al. **2003**: Peripheral signals in the control of satiety and hunger. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.*, 6:621-629
- Dubern B, Clément K, Pelloux V, Froguel P, Girardet JP, Guy-Grand B, Tounian P. **2001**: Mutational analysis of melanocortin-4 receptor, agouti related protein, and alpha-melanocyte-stimulating hormone genes in severely obese children. *J Pediatr.*, 139:204-209
- Eidne KA, Kroeger KM, Hanyaloglu AC. **2002**: Applications of novel resonance energy transfer techniques to study dynamic hormone receptor interactions in living cells. *TRENDS in Endocrinology & Metabolism*, 13(10):415-421
- Elmhurst JL, Xie Z, O'Dowd BF, George SR. **2000**: The splice variant D3nf reduces ligand binding to the D3 dopamine receptor: evidence for heterooligomerization. *Brain Res Mol Brain Res.*, 80(1):63-74
- Elsner A, Tarnow P, Schaefer M, Ambrugger P, Krude H, Grüters A, Biebermann H. **2006**: MC4R oligomerizes independently of extracellular cystein residues. *Peptides*, 27(2):372-9
- Erickson JC, Clegg KE, Palmiter RD. **1996**: Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature*, 381:415-421
- Fagan KA, Graf RA, Tolman S, Schaack J, Cooper DM. **2000**: Regulation of a Ca^{2+} -sensitive adenylyl cyclase in an excitable cell. Role of voltage-gated versus capacitative Ca^{2+} entry. *J Biol Chem.*, 275(51):40187-94

- Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA, O'Rahilly S. **1999**: Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med.*, 341:879-884
- Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S. **2003**: Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin-4 receptor gene. *N Engl J Med.*, 348(12):1085-1095
- Fehm HL, Smolnik R, Kern W, McGregor GP, Bickel U, Born J. **2001**: The melanocortin melanocyte-stimulating hormone/adrenocorticotropin₄₋₁₀ decreases body fat in humans. *J Clin Endocrinol Metab.*, 86:1144-1148
- Feng N, Young SF, Aguilera G, Puricelli E, Adler-Wailes DC, Sebring NG, Yanovski JA. **2005**: Co-occurrence of two partially inactivating polymorphisms of MC3R is associated with pediatric-onset obesity. *Diabetes*, 54(9):2663-2667
- Filizola M, Olmea O, Weinstein H. **2002**: Prediction of heterodimerization interfaces of G-protein coupled receptors with a new subtractive correlated mutation method. *Protein Eng.*, 15:881-885
- Filizola M & Weinstein H. **2005**: The study of G-protein coupled receptor oligomerization with computational modeling and bioinformatics. *FEBS J.*, 272(12):2926-38
- Flier JS. **2004**: Obesity Wars: Molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*, 116:337-350
- Franco R, Casadó V, Cortés A, Ferrada C, Mallol J, Woods A, Lluís C, Canela EI, Ferré S. **2007**: Basic concepts in G-protein-coupled receptor homo- and heterodimerization. *The Scientific World Journal*, 7(S2):48-57
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schiöth HB. **2003**: The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol.*, 63:1256-72
- Friedman JM & Halaas JL. **1998**: Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395:763-770
- Gantz I, Miwa H, Konda Y, Shimoto Y, Tashiro T, Watson SJ, DelValle J, Yamada T. **1993**: Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J Biol Chem.*, 268:15174-15179
- George SR, Fan T, Xie Z, Tse R, Tam V, Varghese G, O'Dowd BF. **2000**: Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. *J Biol Chem.*, 275(34):26128-35
- George SR, O'Dowd BF, Lee SP. **2002**: G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.*, 1:808-820
- Gilchrist A. **2007**: Modulating G-protein-coupled receptors: from traditional pharmacology to allosterics. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 28(8):431-437
- Gomes I, Gupta A, Filipovska J, Szeto HH, Pintar JE, Devi LA. **2004**: A role for heterodimerization of mu and delta opiate receptors in enhancing morphine analgesia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:5135-5139
- Grimsey NL, Goodfellow CE, Scotter EL, Dowie MJ, Glass M, Graham ES. **2008**: Specific detection of CB1 receptors; cannabinoid CB1 receptor antibodies are not all created equal. *Journal of Neuroscience Methods*, 171:78-86
- Grosse R, Schöneberg T, Schultz G, Gudermann T. **1997**: Inhibition of gonadotropin-releasing hormone receptor signalling by expression of a splice variant of the human receptor. *Mol Endocrinol*, 11(9):1305-18

- Gu C & Cooper DM. **2000**: Ca(2+), Sr(2+), and Ba(2+) identify distinct regulatory sites on adenylyl cyclase (AC) types VI and VIII and consolidate the apposition of capacitative cation entry channels and Ca(2+)-sensitive ACs. *J Biol Chem.*, 275(10):6980-6
- Guan XM, Yu H, Palyha, OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJS, Smith RG, Van der Ploeg LHT, Howard AD. **1997**: Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues *Brain Res Mol Brain Res.*, 48:23-29
- Guo W, Shi L, Javitch JA. **2003**: The fourth transmembrane segment forms the interface of dopamine D2 receptor homodimer. *J Biol Chem.*, 278(7):4385-8
- Hagemann D, Meier JJ, Gallwitz B, Schmidt WE. **2003**: Appetite regulation by ghrelin - a novel neuro-endocrine gastric peptide hormone in the gut-brain-axis. *Z Gastroenterol.*, 41:929-36
- Hahn T, Breininger J, Baskin D, Schwartz MW. **1998**: Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature Neurosci.*, 271-272
- Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. **1995**: Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, 269:543-546
- Hani EH, Dupont S, Durand E, Dina C, Gallina S, Gantz I, Froguel P. **2001**: Naturally occurring mutations in the melanocortin receptor 3 gene are not associated with type 2 diabetes mellitus in French Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab.*, 86(6):2895-2898
- Hanke S, Nürnberg B, Groll DH, Liebmann C. **2001**: Cross talk between β -adrenergic and bradykinin B₂ receptors results in cooperative regulation of cyclic AMP accumulation and mitogen-activated protein kinase activity. *Molecular and Cellular Biol.*, (24):8452-8460
- Harrold JA, Widdowson PS, Williams G. **2003**: beta-MSH: a functional ligand that regulated energy homeostasis via hypothalamic MC4-R? *Peptides*, 24:397-405
- Harvey J & Ashford MLJ. **2003**: Leptin in the CNS: much more than a satiety signal. *Neuropharmacology*, 44:845-854
- Hatae N, Yamaoka K, Sugimoto Y, Negishi M, Ichikawa A. **2002**: Augmentation of receptor-mediated adenylyl cyclase activity by Gi-coupled prostaglandin receptor subtype EP3 in G $\beta\gamma$ subunit-independent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290:162-168
- Havel PJ. **2001**: Peripheral signals conveying metabolic information to the brain; short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Exp Biol Med (Maywood)*, 22:6963-77
- Hay DL, Poyner DR, Sexton PM. **2006**: GPCR modulation by RAMPs. *Pharmacol Ther.*, 9:173-197
- Hebebrand J, Ballauff A, Hinney A, Herpertz S, Koop W, Wewetzer C, Ziegler A, Blum WF, Remschmidt H. **1999**: Body weight regulation in anorexia nervosa with special attention to leptin secretion. *Nervenarzt*, 7031-40
- Ho G & MacKenzie RG. **1999**: Functional characterization of mutations in melanocortin-4 receptor associated with human obesity. *J Biol Chem.*, 274(50):35816-22
- Hoffmann C, Gaietta G, Bünemann M, Adams SR, Oberdorff-Maass S, Behr B, Vilardaga JP, Tsien RY, Ellismann MH, Lohse MJ. **2005**: A FIAsh-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. *Nature Methods*, 2(3):171-176
- Holst B & Schwartz TW. **2004**: Constitutive ghrelin receptor activity as a signaling set-point in appetite regulation. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 25(3):113-117
- Holst B, Cygankiewicz A, Jensen TH, Ankersen M, Schwartz TW. **2003**: High constitutive signaling of the ghrelin receptor-identification of a potent inverse agonist. *Molecular Endocrinology*, 17(11):2201-2210

- Houpt KA. **1982**: Gastrointestinal factors in hunger and satiety. *Neurosci Biobehav Rev.*, 6:145-64
- Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paresse PS, Diaz C. **1996**: A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*, 273:974-977
- Hu Y, Bloomquist BT, Cornfield LJ, DeCarr LB, Flores-Riveros JR, Friedman L, Jiang P, Lewis-Higgins L, Sadlowski Y, Schaefer J, Velazquez N, McCaleb ML. **1996**: Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor associated with feeding behaviour. *J Biol Chem.*, 271:26315-26319
- Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F. **1997**: Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, 88 (1):131-141
- Jacoby E, Bouhelal R, Gerspacher M, Seuwen K. **2006**: The 7 TM G-Protein-Coupled Receptor Target Family. *ChemMedChem.*, 1:761-782
- James JR, Oliveira MI, Carmo AM, Iaboni A, Davis SJ. **2006**: A rigorous experimental framework for detecting protein oligomerization using bioluminescence resonance energy transfer. *Nature Methods*, 3(12):1001-1006
- Jiang H, Betancourt L, Smith RG. **2006**: Ghrelin amplifies dopamine signaling by cross talk involving formation of growth hormone secretagogue receptor/dopamine receptor subtype 1 heterodimers. *Molecular Endocrinology*, 20(8):1772-1785
- Jordan BA & Devi LA. **1999**: G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature*, 399(6737):697-700
- Karpa KD, Lin R, Kabbani N, Levenson R. **2000**: The dopamine D3 receptor interacts with itself and the truncated D3 splice variant d3nf: D3-D3nf interaction causes mislocalization of D3 receptors. *Mol Pharmacol.*, 58(4):677-83
- Kearn CS, Blake-Palmer K, Daniel E, Mackie K, Glass M. **2005**: Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol Pharmacol.*, 67(5):1697-704
- Kennedy G. **1953**: The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond.*, B140:578-592
- Kim CS, Lee SH, Kim RY, Kim BJ, Li SZ, Lee IH, Lee EJ, Lim SK, Bae YS, Lee W, Baik JH. **2002**: Identification of domains directing specificity of coupling to G-proteins for the melanocortin MC3 and MC4 receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(35):31310-31317
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. **1999**: Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402:656-60
- Konda Y, Gantz I, DelValle J, Shimoto Y, Miwa H, Yamada T. **1994**: Interaction of dual intracellular signaling pathways activated by the melanocortin-3-receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(18):13162-13166
- Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ, Hastrup S. **1998**: Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature*, 393:72-76
- Kristiansen K. **2004**: Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacology & Therapeutics*, 103:21-80

- Kroeger KM, Pflieger KDG, Eidne KA. **2004**: G-protein coupled receptor oligomerization in neuroendocrine pathways. *Frontiers in Neuroendocrinol.* , 24:254-278
- Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Grüters A. **1998**: Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet.* , 19:155-157
- Krude H, Biebermann H, Schnabel D, Tansek MZ, Theunissen P, Mullis PE, Grüters A. **2003**: Obesity due to proopiomelanocortin deficiency: three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH₄₋₁₀. *J Clin Endocrinol Metab.* , 88:4633-4640
- Kushi A, Sasai H, Koizumi H, Takeda N, Yokoyama M, Nakamura M. **1998**: Obesity and mild hyperinsulinemia found in neuropeptide Y Y1 receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* , 95:15659-15664
- Lambert PD, Couceyro PR, McGirr KM, Dall Vechia SE, Smith Y, Kuhar MJ. **1998**: CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide. *YSynapse*, 29:293-298
- Lawrence CB, Snape AC, Baudoin FM, Luckman SM. **2002**: Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. *Endocrinology*, 143:155-162
- Lee DK, Lanca AJ, Cheng R, Nguyen T, Ji XD, Gobeil F Jr, Chemtob S, George SR, O'Dowd J BF. **2004**: Agonist-independent nuclear localization of the Apelin angiotensin AT1, and bradykinin B2 receptors. *J Biol Chem.*, 279:7901-7908
- Lee SP, O'Dowd BF, Ng GY, Varghese G, Akil H, Mansour A, Nguyen T, George SR. **2000**: Inhibition of cell surface expression by mutant receptors demonstrates that D2 dopamine receptors exist as oligomers in the cell. *Mol Pharmacol.*, 58:120-128
- Lee YS, Poh LK, Kek BL, Loke KY. **2007**: Role of Melanocortin 3 Receptor Gene in Childhood Obesity. *Diabetes*, 56(10):2622-30
- Lee YS, Poh LK, Loke KY. **2002**: A novel melanocortin 3 receptor gene (MC3R) mutation associated with severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab.*, 87(3):1423-6
- Leung PK, Chow KBS, Lau PNL, Chu KM, Chan CB, Cheng CHK, Wise H. **2007**: The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) acts as a dominant-negative mutant of the ghrelin receptor. *Cellular Signalling*, 19:1011-1022
- Levchenko A, Bruck J, Sternberg PW. **2004**: Regulatory modules that generate biphasic signal response in biological systems. *Systems Biology*, 1(1):139-148
- Li WD, Joo EJ, Furlong EB, Galvin M, Abel K, Bell CJ, Price RA. **2000**: Melanocortin 3 receptor (MC3R) gene variants in extremely obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24(2):206-10
- Liu G, Fortin JP, Beinborn M, Kopin AS. **2007**: Four missense mutations in the ghrelin receptor result in distinct pharmacological abnormalities. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322(3):1036-1043
- Lohse MJ. **2006**: G protein-coupled receptors: too many dimers? *Nature Methods*, 3(12):972-973
- Loos RJ, Rankinen T, Rice T, Rao DC, Leon AS, Skinner JS, Bouchard C, Argyropoulos G. **2005**: Two ethnic-specific polymorphisms in the human Agouti-related protein gene are associated with macronutrient intake. *Am J Clin Nutr.*, 82(5):1097-1101
- Lowes VL, Ip NY, Wong Yh. **2002**: Integration of signals from receptor tyrosine kinases and g protein-coupled receptors. *Neurosignals*, 11(1):5-19

- Lubrano-Berthelier C, Durand E, Dubern B, Shapiro A, Dazin P, Weill J, Ferron C, Froguel P, Vaisse C. **2003**: Intracellular retention is a common characteristic of childhood obesity-associated MC4R mutations. *Hum Mol Genet.*, 12(2):145-153
- Maamra M, Milward A, Esfahani HZ, Abbott LP, Metherell LA, Savage MO, Clark AJ, Ross RJ. **2006**: A 36 residues insertion in the dimerization domain of the growth hormone receptor results in defective trafficking rather than impaired signalling. *J Endocrinol*, 188:251-261
- Mandrika I, Petrovska R, Wikberg J. **2005**: Melanocortin receptors form constitutive homo- and heterodimers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 326:349-354
- Margeta-Mitrovic M, Jan YN, Jan LY. **2000**: A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron*, 27(1):97-106
- Marshall FH, White J, Main M, Green A, Wise A. **1999**: GABA(B) receptors function as heterodimers, *Biochem Soc Trans.*, 27(4):530-5
- May LT, Leach K, Sexton PM, Christopoulos A. **2007**: Allosteric Modulation of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 4:71-51
- McGraw DW, Mihlbachler KA, Schwarb MR, Rahman FF, Small KM, Almoosa KF, Liggett SB. **2006**: Airway smooth muscle prostaglandin-EP1 receptors directly modulate β_2 -adrenergic receptors within a unique heterodimeric complex. *J Clin Invest.*, 116:1400-1409
- Menyhért J, Wittmann G, Lechan RM, Keller E, Liposits Z, Fekete C. **2007**: Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) is colocalized with the orexigenic neuropeptide Y and agouti-related protein and absent from the anorexigenic alpha-melanocyte-stimulating hormone neurons in the infundibular nucleus of the human hypothalamus. *Endocrinology*, 148(9):4276-81
- Milligan G & Bouvier M. **2005**: Methods to monitor the quaternary structure of G protein-coupled receptors. *FEBS J.*, 272:2914-2925
- Millington GW. **2006**: Proopiomelanocortin (POMC): the cutaneous roles of its melanocortin products and receptors. *Clin Exp Dermatol.*, 31(3):407-12
- Millington GW, Tung YC, Hewson AK, O'Rahilly S, Dickson SL. **2001**: Differential effects of alpha-, beta- and gamma(2)-melanocyte-stimulating hormones on hypothalamic neuronal activation and feeding in the fasted rat. *Neuroscience*, 108:437-445
- Mohammad S, Baldini G, Granell S, Narduccin P, Martelli AM, Baldini G. **2007**: Constitutive traffic of melanocortin-4 receptor in Neuro2A cells and immortalized hypothalamic neurons. *J Biol Chem.*, 282(7):4963-74
- Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S. **1997**: Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, 38:7903-908
- Moran TH & Kinzig KP. **2004**: Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 286:183-8
- Morton GJ & Schwartz MW. **2001**: The NPY/AgRP neuron and energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord.*, 25:56-62
- Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB, Cone RD. **1994**: Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol.*, 8:1298-1308

- Naveilhan P, Hassani H, Canals JM, Ekstrand AJ, Larefalk A, Chhajlani V, Arenas E, Gedda K, Svensson L, Thoren P, Ernfors P. **1999**: Normal feeding behavior, body weight and leptin response require the neuropeptide Y Y2 receptor. *Nature Med.*, 5:1188-1193
- Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, Christopoulos A. **2003**: International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification.XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol Rev.*, 55:597-606
- Nickolls SA & Maki RA. **2006**: Dimerization of the melanocortin 4 receptor: a study using bioluminescence resonance energy transfer. *Peptides*, 27:380-387
- Nicolaidis S & Even PC. **1990**: The ischymetric control of feeding. *Int J Obes.*, 14 (Suppl 3):35-49; Discussion 50-2
- Niehaus JL, Liu Y, Wallis KT, Egertová M, Bhartur SG, Mukhopadhyay S, Shi S, He H, Selley DE, Howlett AC, Elphick MR, Lewis DL. **2007**: CB1 cannabinoid receptor activity is modulated by the cannabinoid receptor interacting protein CRIP1a. *Molecular Pharmacology*, 72(6):1557-1566
- Nijenhuis WA, Oosterom J, Adan RA. **2001**: AgRP (83-132) acts as an inverse agonist on the human-melanocortin-4 receptor. *Mol Endocrinol.*, 15:164-171
- O'Dowd B, Alijaniaram M, Ji X, Nguyen T, Eglen RM, George SR. **2007**: Using ligand-induced conformational change to screen for compounds targeting G-protein-coupled receptors. *J of Biomolecular Screening*, 12:175-185
- Ollmann MM, Wilson BD, Yamg YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, Barsh GS. **1997**: Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science*, 278:135-138
- Pace AJ, Gama L, Breitwieser GE. **1999**: Dimerization of the calcium-sensing receptor occurs within the extracellular domain and is eliminated by Cys¹⁰¹→Ser and Cys²³⁶→Ser mutations. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(17):11629-11634
- Pagotto U, Cervino C, Vicennati V, Marsicano G, Lutz B, Pasquali R. **2006**: How many sites of action for endocannabinoids to control energy metabolism? *Int J Obes (Lond)*, 30 Suppl 139-43
- Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. **2006 a**: The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev.*, 27(1):73-100
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. **2000**: Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, 289:739-745
- Pantel J, Legendre M, Cabrol S, Hilal L, Hajaji Y, Morisset S, Nivot S, Vie-Luton MP, Grouselle D, de Kerdanet M, Kadiri A, Epelbaum J, Le Bouc Y, Amselem S. **2006**: Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(3):760-768
- Patel TB. **2004**: Single transmembrane spanning heterotrimeric g protein-coupled receptors and their signaling cascade. *Pharmacol Rev.*, 56(3):371-85
- Pedrazzini T, Seydoux J, Künstner P, Aubert JF, Grouzmann E, Beermann F, Brunner HR. **1998**: Cardiovascular response, feeding behavior and locomotor activity in mice lacking the NPY Y1 receptor. *Nature Med.*, 4:722-726
- Pfleger KDG & Eidne KA. **2005**: Monitoring the formation of dynamic G-protein-coupled receptor-protein complexes in living cells. *Biochem J.*, 385:625-637

- Pin JP, Kniazeff J, Liu J, Binet V, Goudet C, Rondard P, Prezeau L. **2005**: Allosteric functioning of dimeric class C G-protein-coupled receptors. *FEBS J.*, 272:2947-2955
- Podingbauer A & Ekmekcioglu C. **2005**: Regulation der Nahrungsaufnahme: Physiologische Mechanismen und klinische Relevanz. *J. Ernährungsmed.*, 1:22-29
- Rached M, Buronfosse A, Begeot M, Penho A. **2004**: Inactivation and intracellular retention of the human I183N mutated melanocortin 3 receptor associated with obesity. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1689:229-234
- Rashid AJ, So CH, Kong MM, Furtak T, El-Ghundi M, Cheng R, O'Dowd BF, George SR. **2007**: D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 104:654-659
- Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GF, Weis WI, Kobilka BK. **2007**: Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, 450(7168):383-7
- Rios C, Gomes I, Devi LA. **2006**: μ opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuritogenesis. *British Journal of Pharmacology*, 148:387-395
- Roselli-Reh fuss L, Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Low MJ, Tatro JB, Entwistle ML, Simerly RB, Cone RD. **1993**: Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 90:8856-8860
- Rossi M, Kim MS, Morgan DG, Small CJ, Edwards CM, Sunter D, Abusnana S, Goldstone AP, Russel SH, Stanley SA, Smith DM, Yagaloff K, Ghatel MA, Bloom SR. **1998**: A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology*, 139:4428-4431
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. **1977**: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci.*, 91:5463-5467
- Satoh N, Ogawa Y, Katsuura G, Numata Y, Masuzaki H, Yoshimasa Y, Nakao K. **1998**: Satiety effect and sympathetic activation of leptin are mediated by hypothalamic melanocortin system. *Neurosci Lett.*, 249:107-110
- Schaln-Jantti C, Valli-Jaakola K, Oksanen L, Martelin E, Laitinen K, Krusius T, Mustajoki P, Heikinheimo M, Kontula K. **2003**: Melanocortin-3-receptor gene variants in morbid obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.*, 27(1):70-74
- Schertler GF. **1998**: Structure of rhodopsin. *Eye*, 12(Pt 3b):504-510
- Schiöth HB. **2006**: G protein-coupled receptors in regulation of body weight. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*, 5:241-249
- Schmitt JM & Stork PJS. **2000**: β_2 -adrenergic receptor activates extracellular signal-regulated Kinases (ERKs) via the small G protein Rap1 and the serine/threonine Kinase B-Raf. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(33):25342-25350
- Schulz A, Bruns K, Henklein P, Krause G, Schubert M, Gudermann T, Wray V, Schultz G, Schöneberg T. **2000a**: Requirement of specific intrahelical interactions for stabilizing the inactive conformation of glycoprotein hormone receptors. *J Biol Chem.*, 275:37860-37869
- Schulz A, Grosse R, Schultz G, Gudermann T, Schöneberg T. **2000**: Structural implication for receptor oligomerization from functional reconstitution studies of mutant V2 vasopressin receptors. *J Biol Chem.*, 275:2381-2389

- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. **2000**: Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404:661-671
- Schwartz T & Blobel G. **2003**: Structural basis for the function of the beta subunit of the eukaryotic signal recognition particle receptor. *Cell*, 112:793-803
- Sealfon SC, Chi L, Ebersole BJ, Rodic V, Zhang D, Ballesteros JA, Weinstein H. **1995**: Related contribution of specific helix 2 and 7 residues to conformational activation of the serotonin 5-HT_{2A} receptor. *J Biol Chem.*, 270(28):16683-8
- Seidah NG, Benjannet S, Hamelin J, Mamarbachi AM, Basak A, Marcinkiewicz J, Mbikay M, Chretien M, Marcinkiewicz M. **1999**: The subtilisin/kexin family of precursor convertases. Emphasis on PC1, PC2/7b2, POMC and the novel enzyme SKI-1. *Ann NY Acad Sci.*, 885:57-74
- Stanley BG, Daniel DR, Chin AS, Leibowitz SF. **1985**: Paraventricular nucleus injections of peptide YY and neuropeptide Y preferentially enhance carbohydrate ingestion. *Peptides*, 6:1205-1211
- Ste Marie L, Miura GI, Marsh DJ, Yagaloff K, Palmiter RD. **2000**: A metabolic defect promotes obesity in mice lacking melanocortin-4 receptors. *Proc Natl Acad Sci.*, 97(22):12339-12344
- Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD. **1998**: A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nature Genet.*, 18:213-215
- Sunahara RK & Taussig R. **2002**: Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signalling. *Molecular Interventions*, 2(3):168-184
- Tao YX & Segaloff DL. **2004**: Functional characterization of melanocortin-3 receptor variants identify a loss-of-function mutation involving an amino acid critical for G protein-coupled receptor activation. *J Clin Endocrinol Metab.*, 89(8):3936-3942
- Tarnow P, Rediger A, Brumm H, Ambrugger P, Rettenbacher E, Widhalm K, Hinney A, Kleinau G, Schäfer M, Hebebrand J, Krause G, Grüters A, Biebermann H. **2008**: A heterozygous mutation in the third transmembrane domain causes a dominant-negative effect on signaling capability of the MC4R. *Obesity Facts*, 1(3):155-162
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. **1995**: Identification and expression cloning of a leptin receptor OB-R. *Cell*, 83:1263-1271
- Terrillon S & Bouvier M. **2004**: Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep.*, 5:30-34
- Terrillon S, Durroux T, Mouillac B, Breit A, Ayoub MA, Taulan M, Jockers R, Barberis C, Bouvier M. **2003**: Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Mol Endocrinol.*, 17:677-691
- Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. **2000**: Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, 407:908-913
- Uberti MA, Hague C, Oller H, Minneman KP, Hall RA. **2005**: Heterodimerization with beta2-adrenergic receptors promotes surface expression and functional activity of alpha1D-adrenergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther.*, 313(1):16-23
- Vaisse C, Clement K, Durand E, Hercberg S, Guy-Grand B, Froguel P. **2000**: Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous causes of morbid obesity. *J Clin Invest.*, 106:253-62

- Valverde P, Healy E, Sikkink S, Haldane F, Thody AJ, Carothers A, Jackson IJ. **1996**: The Asp84Glu variant of the melanocortin 1 receptor (MC1R) is associated with melanoma. *Hum Mol Genet.*, *5*(10):1663-6
- Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT, Brown A, Rodriguez SS, Weller JR, Wright AC, Bergmann JE, Gaitanaris GA. **2003**: The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci USA.*, *100*:4903-4908
- Wager-Miller J, Westenbroek R, Mackie K. **2002**: Dimerization of G protein-coupled receptors: CB1 cannabinoid receptors as an example. *Chemistry and Physics of Lipids*, *121*:83-89
- Waldhoer M, Fong J, Jones RM, Lunzer MM, Sharma SK, Kostenis E, Portoghesi PS, Whistler JL. **2005**: A heterodimer-selective agonist shows in vivo relevance of G protein-coupled receptor dimers. *Proc Natl Acad Sci USA.*, *102*:9050-9055
- Wang HJ, Geller F, Dempfle A, Schäuble N, Friedel S, Lichtner P, Fontenla-Horro F, Wudy S, Hagemann S, Gortner L, Huse K, Remschmidt H. **2004**: Ghrelin receptor gene: identification of several sequence variants in extremely obese children and adolescents, healthy normal-weight and underweight students, and children with short normal stature. *J Clin Endocrinol Metab.*, *89*:157-162
- Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rosetti L. **1998**: A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature*, *393*:684-688
- White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, Barnes AA, Emson P, Foord SM, Marshall FH. **1998**: Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature*, *396*:679-682
- Whitfield PL, Seeburg PH, Shine J. **1982**: The human pro-opiomelanocortin gene: organization, sequence and interspersed with repetitive DNA. *DNA*, *1*:133-143
- Wickman K & Clapham DE. **1998**: Ionchannel regulation by G proteins. *Physiol Rev.*, *75*(4):865-85
- Wilding JP. **2002**: Neuropeptides and appetite control. *Diabet Med.*, *19*:619-27
- Wilson BD, Bagnol D, Kaelin CB, Ollmann MM, Gantz I, Watson SJ, Barsh GS. **1999**: Physiological and anatomical circuitry between Agouti-related protein and leptin signalling. *Endocrinology*, *140*:2387-2397
- Wong J, Love DR, Kyle C, Daniels A, White M, Stewart AW, Schnell AH, Elston RC, Holdaway IM, Mountjoy KG. **2002**: Melanocortin-3 receptor gene variants in a Maori kindred with obesity and early onset type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.*, *58*(1):61-71
- Woods SC, Seeley RJ, Porte D, Jr., Schwartz MW. **1998**: Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science*, *280*:1378-83
- Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Dhillo WS, Seal LJ, Cohen MA, Batterham RL, Taheri S, Stanley SA, Ghatei MA, Bloom SR. **2001**: Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes*, *50*:2540-2547
- Yaswen L, Diehl N, Brennan MB, Hochgeschwender U. **1999**: Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nature Med.*, *5*:1066-1070
- Yeo GS, Lank EJ, Farooqi IS, Keogh J, Challis BG, O'Rahilly S. **2003**: Mutations in the human melanocortin-4 receptor gene associated with severe familial obesity disrupts receptor function through multiple molecular mechanisms. *Hum Mol Genet.*, *12*(5):561-574
- Zanna PT, Sánchez-Laorden BL, Pérez-Oliva AB, Turpín MC, Herraiz C, Jiménez Cervantes C, García-Borrón JC. **2008**: Mechanism of dimerization of the human melanocortin 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun.*, *368*(2):211-6.

- Zarjevski N, Cusin I, Vetto R, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. **1993**: Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology*, 133:1753-1758
- Zeng F & Wess J. **2000**: Molecular aspects of muscarinic receptor dimerization. *Neuropsychopharmacology*, 23:19-31
- Zhang L, Li WH, Anthonavage M, Eisinger M. **2006**: Melanocortin-5 receptor: a marker of human sebocyte differentiation. *Peptides*, 27(2):413-20
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. **1994**: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372:425-432
- Zhang Z, Sun S, Quinn SJ, Brown EM, Bai M. **2001**: The extracellular calcium-sensing receptor dimerizes through multiple types of intermolecular interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(7):5316-5322
- Zhu X & Wess J. **1998**: Truncated V2 vasopressin receptors as negative regulators of wild-type V2 receptor function. *Biochemistry*, 37(45):15773-84

6.1 Nachweis der verwendete GPCRs der hypothalamischen Appetitregulation

- GHSR Schiöth HB. **2006**: G protein-coupled receptors in regulation of body weight. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*. 5 S.241-249
- GHSR Bagnol D. **2004**: G protein-coupled receptors in hypothalamic circuits involved in metabolic diseases. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*. 7(5) S.665-682
- NPY2R Bagnol D. **2004**: G protein-coupled receptors in hypothalamic circuits involved in metabolic diseases. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*. 7(5) S.665-682
- NPY2R Broberger C, Landry M, Wong H, Walsh JN, Hökfelt T. **1997**: Subtypes Y1 and Y2 of the neuropeptide Y receptor are respectively expressed in pro-opiomelanocortin-and neuropeptide-Y-containing neurons of the rat hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroendocrinology*. 66(6) S.393-408
- μ-OPR Schiöth HB. **2006**: G protein-coupled receptors in regulation of body weight. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*. 5 S.241-249
- μ-OPR Bagnol D. **2004**: G protein-coupled receptors in hypothalamic circuits involved in metabolic diseases. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*. 7(5) S.665-682
- μ-OPR Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ. **2004**: Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*. 411(6836) S.480-484
- GPR7 Ishii M, Fei H, Friedman JM. **2003**: Targeted disruption of GPR7, the endogenous receptor for neuropeptides B and W, leads to metabolic defects and adult-onset obesity. *PNAS*. 100(18) S.10540-10545
- GPR7 Lee DK, Nguyen T, Porter CA, Cheng R, George SR, O'Dowd BF. **1999**: Two related G-protein-coupled receptors: The distribution of GPR7 in rat brain and the absence of GPR8 in rodents. *Molecular Brain Research*. 71 S.96-103
- 5-HT_{1B} Schiöth HB. **2006**: G protein-coupled receptors in regulation of body weight. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*. 5 S.241-249
- CB1R Bagnol D. **2004**: G protein-coupled receptors in hypothalamic circuits involved in metabolic diseases. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*. 7(5) S.665-682
- CB1R De Jesús ML, Sallés J, Meana JJ, Callado LF. **2006**: Characterization of CB1 cannabinoid receptor immunoreactivity in post-mortem human brain homogenates. *Neuroscience*. 140 S.635-643

7. Abkürzungsverzeichnis

Alle hier aufgelisteten Abkürzungen sind im Text beim ihrem Erstgebrauch erklärt. Abkürzungen von englischen Fachausdrücken wurden gegebenenfalls so wiedergegeben, dass die Buchstabenkombination verständlich bleibt und dem entsprechend angepasst.

ACTH	adrenocorticotrophes Hormon
AgRP	Agouti-Related Protein
ARC	Nucleus arcuatus
beta2-AR	β -adrenerger Rezeptor Typ 2
beta-LPH	β -Lipotropin
BRET	Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CART	cocaine and amphetamine regulated transcript
CB1R	Cannabinoid -1-Rezeptor
cDNA	komplementäre Deoxyribonukleinsäure
CFP	cyan-fluoreszierendes Protein
COS-7	CV1 Origin SV40 Fibroblastenzellen der Niere von <i>Ceropithecusaethiops</i>
cpm	counts per minute
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dubleccos Moodified Eagle Medium
DMN	Nucleus dorsomedialis
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
ecl	extrazelluläre Schleife
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
E _{max}	Maximalstimulation
ER	endoplasmatisches Retikulum
FKS	fötales Kälberserum

FLAG	Epitop mit der Aminosäuresequenz DYKDDDDK
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
GHSR	Growth hormone secretagogue Rezeptor
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GPR7	G-Protein gekoppelter Rezeptor 7
G-Protein	regulatorisches heterotrimeres Guaninnukleotid-bindendes Protein
HA	Hämagglutinin, Epitop mit der Aminosäuresequenz YPYDVPDA
HEK293	Human Embryonic Kidney
5-HTR _{1B}	Serotonin-1B-Rezeptor
IBMX	3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin
icl	intrazelluläre Schleife
IP1	D-myo-Inositol 1 Phosphat
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IR	Insulinrezeptor
LHA	laterales hypothalamisches Areal
MC1R	Melanocortin-1-Rezeptor
MC2R	Melanocortin-2-Rezeptor
MC3R	Melanocortin-3-Rezeptor
MC4R	Melanocortin-4-Rezeptor
MC5R	Melanocortin-5-Rezeptor
MEM	„minimum essential medium“
MSH	Melanozytenstimulierendes Hormon
μ-OPR	μ-Opioid Rezeptor
NDP-α-MSH	[Nle4-Dphe7]-α-MSH
NPY	Neuropeptide Y
NPY2R	Neuropeptide 2 Rezeptor
Ob-R	Leptinrezeptor
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PLC	Phospholipase C
POD	Meerrettich-Peroxidase

Abkürzungsverzeichnis

POMC	Proopiomelanocortin
PVN	nucleus paraventricularis
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
rM3R	Ratten-muscarine Rezeptor 3
TM	Transmembrandomäne
VMH	ventromedialer Hypothalamus
YFP	gelb-fluoreszierendes Protein
ZNS	Zentralnervensystem

6.2 Abkürzungen der Aminosäuren

Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode	Aminosäure
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
/	Nle	Norleucin

8. Veröffentlichungen

Publikationen

Fiedler, B., Broc, D., Schubert, H., Rediger, A., Börner, T., Wilde, A. **2004:** *Involvement of cyanobacterial phytochromes in growth under different light qualities and quantities*. Photochemistry and Photobiology, 79(6):551-555

Rediger, A., Axmann, I., Hess, W. **2005:** *Analyzing the Prochlorococcus light-harvesting system: regulatory sequence elements and novel antisera*. International Society of Photosynthesis, 981-983 (Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives, A. van der Est and D. Bruce Eds)

Tarnow P, Rediger A, Brumm H, Ambrugger P, Rettenbacher E, Wildhalm K, Hinney A, Kleinau G, Schäfer M, Hebebrand J, Krause G, Grüters A, Biebermann H. **2008:** *A heterozygous mutation in the third transmembrane domain causes a dominant-negative effect on signaling capability of the MC4R*. Obesity Facts, 1(3):155-162

Rediger A, Tarnow P, Bickenbach A, Schaefer M, Krude H, Grüters A, Biebermann H. **2009:** *Dimerization of hypothalamic GPCRs involved in weight regulation*. Obesity Facts, 2(2):61-140

Rediger A, Tarnow P, Lagemann C., Schaefer M, Grüters A, Biebermann H. *Identification of dimerization domains of the MC4R..*, in Vorbereitung

Rediger A, Tarnow P, Rosenbaum P.-M., Schaefer M, Strotmann R, Schöneberg T, Grüters A, Biebermann H. *Functional relevance of interaction of MC3R-GHSR dimerization..*, in Vorbereitung

Kongressbeiträge

Rediger, A., Steglich, C., Hess, W.(2003) *Synechocystis* as a model system to test the function of light harvesting and pigment photosynthesis genes from *Prochlorococcus*. Molecular Bioenergetics of Cyanobacteria (EURESCO), Acquafredda di Maratea, Italien (**Poster**)

Rediger, A., Steglich, C., Hess, W. (2004) Light signal perception and transduction in marine cyanobacteria. Bacterial Neural Networks (EURESCO), San Feliu de Guixols, Spanien (**Poster**)

Rediger, A., Hess, W. (2004) Functional analysis of *Prochlorococcus* pigment-binding. 3rd Margenes meeting, Sant Agata de Goti, Italien (**Vortrag**)

Rediger, A., Hess, W. (2004) Functional analysis of *Prochlorococcus* pigment-binding proteins. 13th International Congress of Photosynthesis, Montreal, Kanada (**Poster**)

Rediger, A., Hess, W. (2005) Functional analysis of *Prochlorococcus* pigment-binding proteins. International Symposium on the Genomics of Marine Phytoplankton, Roscoff, Frankreich (**Poster**)

Tarnow P, Rediger A., Biebermann H, Grüters A. (2006) Heterodimerization of hypothalamic G-protein coupled receptors involved in body weight regulation. Bregenz Summer School on Endocrinology, Bregenz, Österreich (**Poster**)

Rediger, A., Tarnow P, Schaefer M, Grüters A, Biebermann H. (2007) Heterodimerization of hypothalamic G-protein coupled receptors involved in body weight regulation. 51. Symposion der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE), Salzburg, Österreich (**Poster**)

Rediger, A., Tarnow P, Schaefer M, Grüters A, Biebermann H. (2007) Heterodimerization of hypothalamic G-protein coupled receptors involved in body weight regulation. 9th European Congress of Endocrinology (ECE), Budapest, Ungarn (**Poster**)

Rediger, A., Tarnow P, Schaefer M, Strotmann R, Schöneberg T, Grüters A, Biebermann H. (2007) Interaktion hypothalamisch exprimierter Rezeptoren in der Gewichtregulation. Jahrestagung der Deutschen Adipositas Gesellschaft, München, Deutschland (**Vortrag**)

Rediger, A., Tarnow P, Bickenbach A, Schaefer M, Strotmann R, Schöneberg T, Grüters A, Biebermann H. (2008) Characterization of hypothalamic G-protein coupled receptors which are involved in body weight regulation. 10th European Congress of Endocrinology (ECE), Berlin, Deutschland (**Vortrag**)

9. Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die Arbeit mit dem Titel „Charakterisierung von Interaktionen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren der hypothalamischen Appetitregulation“ selbstständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Des Weiteren erkläre ich meine Kenntnisnahme der dem angestrebten Verfahren zugrunde liegenden Promotionsverordnung. Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und bin nicht im Besitz eines entsprechenden Doktorgrades.

Berlin, den 17.09.2008

Anne Rediger